

# **Multiphotonen-Fluoreszenzmikroskopie an polymeren Systemen**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften

der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Jan-Eric Ehlers

aus Bremerhaven

1. Referent: Professor Dr. Karl-Heinz Gericke

2. Referent: Professor Dr. Peter Jomo Walla

eingereicht am: 02.03.2011

mündliche Prüfung (Disputation) am: 19.04.2011

Druckjahr 2011

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Publikationen**

Ehlers, J.-E., Hinze, A., Klages, C.-P.; Gericke, K.-H. *Three-dimensional fluorescence imaging of DBD-plasma aminated porous polypropylene*, Proceedings International Symposium on Plasma Chemistry 19 (ISPC 19), P1.8.27 (2009).

### **Tagungsbeiträge**

Ehlers, J.-E.; Denicke, S.; Quentmeier, S.; Gericke, K.-H. *Fluorescence Analysis Methods for Local Chemical Functionalized Surfaces*, Poster, Microscience 2008, London (2008).

Ehlers, J.-E.; Denicke, S.; Quentmeier, S.; Gericke, K.-H. *Fluorescence Analysis Methods for Local Chemical Functionalized Surfaces*, Poster, 1<sup>st</sup> International Symposium of the Volkswagen Foundation on Functional Surfaces, Bremen (2008).

Ehlers, J.-E., Hinze, A., Klages, C.-P.; Gericke, K.-H. *Three-dimensional fluorescence imaging of DBD-plasma aminated porous polypropylene*, International Symposium on Plasma Chemistry 19 (ISPC 19), Bochum (2009).

### **Berichte**

Ehlers, J.-E.; Gericke, K.-H. Abschlussbericht zum VolkswagenStiftungs-Projekt *Micro-structured Surface Treatment by Atmospheric-Pressure Microplasmas* (2009).





# INHALTSVERZEICHNIS

Kapitel 1	Einleitung.....	1
Kapitel 2	Theoretische Grundlagen.....	6
2.1	Licht als elektromagnetische Welle .....	6
2.2	Absorption und Fluoreszenz .....	9
2.3	Zweiphotonenfluoreszenzmikroskopie .....	13
2.4	Fluoreszenzanisotropie.....	19
2.5	Photobleichen und FRAP .....	25
Kapitel 3	Materialien und Methoden.....	29
3.1	Messprinzipien.....	29
3.1.1	Time-Gated Fluorescence Imaging .....	30
3.1.2	Time-Correlated Single Photon Counting (TCSPC) .....	31
3.1.3	Vergleich der Messprinzipien.....	32
3.2	Experimenteller Aufbau für dreidimensionales Aminogruppen-Imaging .....	33
3.3	Experimenteller Aufbau für Anisotropiemessungen.....	38
3.4	Farbstofflabeling plasma-aminierter Polymere.....	41
3.4.1	Eigenschaften der verwendeten Farbstoffe.....	41
3.4.2	Probenherstellung und Labelingprozedur.....	45
3.5	Herstellung plasma-aminierter Polymersubstrate .....	48
3.6	Fluorophore Gruppe der Grün fluoreszierenden Proteine (GFP).....	51
3.7	Herstellung Farbstoff-gelabelter Hydrogele .....	53
3.8	Statistik zur Datenauswertung .....	56
Kapitel 4	Ergebnisse und Diskussion.....	59
4.1	Dreidimensionale Darstellung von Aminogruppen auf plasmabehandelten Polymeroberflächen .....	59
4.1.1	BOPP-Folien.....	60

4.1.2	PP/C-Komposite .....	66
4.1.3	DBD-Aminierung von Fasern .....	69
4.1.4	Hohlfasermembrane.....	75
4.1.5	Polypropylen-Membrane .....	78
4.1.6	Amindiskriminierung durch NBD-F .....	84
4.1.7	Amindiskriminierung durch Doppellabeling.....	88
4.2	Charakterisierung von Hydrogelen mittels Sensormolekülen .....	97
4.2.1	Fluoreszenzanisotropie-Messungen.....	98
4.2.1.1	Cumarin 314.....	98
4.2.1.2	GFP-Mutanten.....	101
4.2.2	FRAP- und Bleich-Messungen an mTagGFP-Hydrogelen .....	127
Kapitel 5	Zusammenfassung und Ausblick.....	141
Kapitel 6	Literaturverzeichnis .....	149

# Kapitel 1      EINLEITUNG

Die Grundzüge der Mikroskopie reichen bis in das 17. Jahrhundert zurück und sind vor allem Pionierarbeiten von Robert Hooke und Antoni van Leeuwenhoek zuzuschreiben.[1–3] Durch die Entwicklung des Mikroskops gelang die Darstellung von bisher für das menschliche Auge nicht sichtbaren Objekten wie Zellen oder Bakterien, so dass sich hierdurch ein neues Feld in der Biologie auftat. Theoretische Grundlagen von Ernst Abbe und praktische Entwicklungsarbeit von Carl Zeiss zusammen mit Otto Schott leiteten im 19. Jahrhundert den Beginn der modernen Mikroskopie ein.[4–6] Anfang des 20. Jahrhunderts wurde neben der klassischen Betrachtung der vergrößerten Gegenstände im Durchlicht erstmals von Lumineszenzerscheinungen durch August Köhler und Henry Siedentopf berichtet.[5] Hier wird das Eigenleuchten eines Stoffes nach Anregung der Moleküle mittels kurzzeitigem Licht ausgenutzt, auch als Fluoreszenz beziehungsweise Phosphoreszenz bekannt. Oskar Heimstädt publizierte 1911 seine Arbeiten zu diesem Thema unter dem Titel „Das Fluoreszenzmikroskop“.[7,8]

Zu Beginn der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts beeinflussten zwei Entwicklungen maßgeblich den Fortschritt in der Mikroskopie. Die Entwicklung des Lasers durch Theodore H. Maiman im Jahre 1960 nach umfangreichen Vorarbeiten mehrerer Wissenschaftler ermöglicht es, Lichtquellen zum Mikroskopieren einzusetzen, die eine hohe Präzision (räumliche und zeitliche Kohärenz) und nahezu beliebige Manipulation der Eigenschaften der Lichtquelle erlauben (Wellenlänge, Polarisierung, ultrakurze Pulse).[9] Wenige Jahre zuvor sorgte Marvin Minsky durch die Innovation der konfokalen Mikroskopie für eine apparative Verbesserung.[10] Beide Techniken kombinierten Thomas und Christoph Cremer im Jahre 1978 zu einem konfokalen Laserrastermikroskop.[11] Gut ein Jahrzehnt später gelang es Denk, Strickler und Webb im Jahre 1990 ein Laserrastermikroskop auf Basis von Zweiphotonenabsorption zu entwickeln,[12] nachdem diese bereits 1931 von Maria Göppert-Mayer vorausgesagt wurde[13] und 1961 erstmals experimentell durch zweiphotonen-induzierte Fluoreszenz von Kaiser und Garrett belegt wurde.[14] Mit der Zweiphotonen- und konfokalen Einphotonenmikroskopie kann eine Probe dreidimensional untersucht werden. Durch Verwendung eines Lasers können fluoreszierende Moleküle aus Volumina kleiner als einem Femtoliter beobachtet werden.[15] Mittlerweile ist die Detektion von einzelnen Molekülen problemlos möglich.[16] Zum Ende des 20. Jahrhunderts ist es gelungen, das 1873 von Ernst Abbe aufgestellte Gesetz des Auflösungslimits der Lichtmikroskopie, gegeben durch die Hälfte der Anregungswellenlänge,[17] zu durchbrechen. Die Techniken, die aktuell

noch Gegenstand der Forschung sind, versuchen die Größe des beugungslimitierten Fokus zu verringern (STED),[18] einzelne Moleküle mit hoher Genauigkeit zu lokalisieren (PALM, STORM)[19,20] oder die Ausleuchtung der Probe zu strukturieren[21,22] und damit eine höhere Auflösung zu erreichen.

Die Verwendung der Laserfluoreszenzmikroskopie ist ein Meilenstein in der Medizin und Zellbiologie. Mit Hilfe dieser Technik können Mechanismen des Zellmetabolismus oder der Zellteilung *in vitro* oder sogar *in vivo* aufgeklärt und verstanden werden.[23,24] In der Materialanalyse hingegen hat sich die Fluoreszenzmikroskopie noch nicht so stark entwickelt. Hier kommen eher klassische Durchlichttechniken wie Polarisations- oder Phasenkontrastmikroskopie zum Einsatz. Außerdem finden in diesem Bereich Elektronen- oder Rasterkraftmikroskope eine breite Anwendung, dies sich vor allem durch eine um circa zwei Größenordnungen höhere Auflösung und hohe Schärfentiefe auszeichnet.[25] Für die Anwendung an lebenden Zellen ist hingegen die notwendige Probenpräparation unter nicht-physiologischen Bedingungen und der Beschuss der Probe mit energiereichen Elektronen nachteilig, was sicherlich ein Aspekt ist, der die Entwicklung der Fluoreszenzmikroskopie begünstigt hat. Fluoreszenzmikroskopische Methoden können jedoch auch im Bereich der Materialwissenschaften einen wertvollen Beitrag liefern. Die eingesetzten Farbstoffe fungieren als hochempfindliche molekulare Sensoren ihrer Mikroumgebung und zeigen zum Teil eine hohe chemische Spezifität bei einer oft ausreichenden räumlichen Auflösung und hohen Sensitivität. Damit ist die Fluoreszenzmikroskopie komplementär zu bereits etablierten Analysemethoden in den Materialwissenschaften anzusehen.

In der vorliegenden Arbeit liegt der Fokus auf der Untersuchung von polymeren Systemen. Die Polymerchemie begründet sich in den Pionierarbeiten von Hermann Staudinger in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts.[26] Heutzutage sind synthetische Polymere aus unserem Alltag nicht mehr wegzudenken. Jedoch ist auch hier die Natur das Vorbild, die zum Beispiel Zellulose als Baumaterial verwendet. Polymere Systeme sind vielseitig, jedoch auch komplex. Die Struktur und Funktion von polymeren Systemen auf molekularer Ebene zu verstehen ist ein wichtiger Aspekt für die weitere Forschung und Entwicklung in der Polymerchemie.

Im ersten Teil dieser Arbeit liegt der Fokus auf Polyolefinen, wie zum Beispiel Polyethylen oder Polypropylen, die hervorragende Eigenschaften als Trägermaterial für Microarrays besitzen.[27] Der Begriff Microarray ist eine Sammelbezeichnung für molekularbiologische Untersuchungssysteme auf kleinsten Raum.[28] Man spricht daher oft auch von Biochips oder „*lab on a chip*“. Auf kleinen Testfeldern werden biologische Reaktionen im Miniaturmaßstab durchgeführt, wie zum Beispiel Antikörpertests, Proteininteraktionen oder

DNA-Nachweise. Solche Microarrays erlauben die Parallelanalyse von tausenden von Einzelnachweisen und sind damit zum Hochdurchsatz-Screening geeignet, wie es zum Beispiel in der Pharmaforschung angewendet wird. Ein neuartiger Ansatz ist dabei, die Reaktion nicht in kleinen Vertiefungen stattfinden zu lassen (sogenannte *wells*), sondern als Mikrotröpfchen auf einer Polymeroberfläche, was Probenmengen in der Größenordnung von Picomol oder sogar darunter erlaubt.[29] Hierbei erweist es sich als vorteilhaft, die Polymere lokal chemisch zu modifizieren, um Biomoleküle kovalent an die Oberfläche anbinden zu können. Dies lässt sich elegant durch einen Plasmaprozess realisieren, durch den ortsselektiv Aminogruppen auf der Oberfläche des Polymers erzeugt und kovalent angebunden werden. Die Aminogruppen dienen dabei als Ankergruppe beziehungsweise als Startpunkt für den Aufbau eines Bioassays. Dieser Ansatz wurde in dem Projekt „Microstructured Surface Treatment by Atmospheric-Pressure Microplasmas“ verfolgt. Dabei handelt es sich um ein von der VolkswagenStiftung gefördertes Projekt im Rahmen der Initiative „Innovative Methods for Manufacturing of Multifunctional Surfaces“. Das Projekt beinhaltet eine interdisziplinäre Zusammenarbeit mehrerer Institute der TU Braunschweig und des Helmholtz Zentrums für Infektionsforschung in Braunschweig.\* Als Anschlussförderung wurde das Projekt „Plasma Printing of Thin Films with Porous Metal Electrodes – P<sup>3</sup>M“ bewilligt, das erst Ende 2011 auslaufen wird. Um die im Plasma ablaufenden Prozesse und die dadurch entstehenden Oberflächenmodifikation durch Insertion funktioneller Gruppen besser verstehen zu können, bedarf es einer genauen Analyse des Verfahrens. Dabei kommen verschiedene chemische Analysemethoden zum Einsatz, wie die ATR-FTIR-Spektroskopie, Rasterelektronenmikroskopie mit kombinierter energiedispersiver Röntgenspektroskopie (REM-EDX) oder auch Sekundärionen-Massenspektrometrie (SIMS).[30–32] Die genannten Methoden besitzen aber entweder eine geringe Tiefenauflösung beziehungsweise Eindringmesstiefe, hohe Detektionslimits oder auch eine schlechte Ortsauflösung. Der Einsatz von Zweiphotonen-Fluoreszenzmikroskopie hingegen liefert darüber hinaus zusätzliche Informationen, die zum Teil die Limitierungen der anderen Methoden überwindet oder mehrere Vorteile der Methoden miteinander kombiniert. So lassen sich Aminogruppen und im spezielleren spezifisch primäre und sekundäre Aminogruppen quantitativ dreidimensional ortsaufgelöst mit einer Auflösung von bis zu etwa 200 nm darstellen bei gleichzeitig sehr niedrigen Detektionslimits. Es können nicht nur kompakte Oberflächen wie Polymerfolien untersucht werden, sondern auch komplexe Strukturen wie zum Beispiel poröse Substrate; auch der

---

\* Institut für Oberflächentechnik (IOT) – Prof. Klages, Institut für Hochspannungstechnik und Elektrische Energieanlagen (HTEE) – Prof. Kurrat, Institut für Mikrotechnik (IMT) – Prof. Büttgenbach, Institut für Physikalische Chemie (IPC) – Prof. Gericke, Helmholtz Zentrums für Infektionsforschung – Dr. Frank

Transfer auf andere Materialien wie Textilfasern ist damit möglich. Trotz des großen Potentials fluoreszenzmikroskopischer Methoden wurden bisher nur wenige Anwendungen für die Oberflächenuntersuchung solcher Materialien berichtet. Die von Hoffmann *et al.* beschriebenen Probleme bei der fluorometrischen Untersuchung von Oberflächen kann durch die in dieser Arbeit verwendete zeitaufgelöste Zweiphotonen-Fluoreszenzmikroskopie und die sorgfältige Auswahl geeigneter Farbstoffe größtenteils überwunden werden, so dass hiermit eine leistungsfähige Analysemethode für Oberflächen zur Verfügung steht.[33]

Der Schwerpunkt des zweiten Teils dieser Arbeit liegt auf der Untersuchung von Hydrogelen. Als solche bezeichnet man ein Wasser enthaltendes dreidimensionales Netzwerk eines wasserunlöslichen Polymers.[34] Hydrogele finden bereits breite Anwendung im Alltag, zum Beispiel als Kontaktlinsen, Implantate oder Wundpflaster.[35] Der mengenmäßig größte Bereich ist wohl die Verwendung als Superabsorber in Hygieneprodukten.[36] Sie sind fähig, das bis zu Tausendfache ihre Eigengewichts an Wasser aufzunehmen. Aktueller Gegenstand der Forschung sind sogenannte Smarte Hydrogele, die gegenüber einer physikalischen Umgebungsgröße wie dem pH-Wert mit Volumenänderung reagieren und damit als chemischer Sensor verwendet werden können.[37,38] Ein weiteres wichtiges Anwendungsgebiet von Hydrogelen liegt in Drug Delivery Systemen (DDS). Hierunter wird der Prozess verstanden, einen pharmazeutisch wirksamen Stoff an sein Bestimmungsziel zu bringen. Klassische Wege gehen über den Verdauungstrakt (oral), die Haut bzw. Schleimhäute (dermal, sublingual, rektal), die Atemwege (inhalativ) oder werden gespritzt (intravenös, subdermal).[39] In der modernen Medizin kommen immer häufiger Medikamente auf Protein- oder auch DNA-Basis zum Einsatz.[40,41] Solche hochspezifischen Moleküle, zu denen auch Antikörper gehören, sind entweder zu groß um bestimmte Barrieren zu passieren (wie zum Beispiel Schleimhäute) oder werden auf dem Weg zum Zielort zersetzt (zum Beispiel enzymatischer Abbau im Magen-Darm-Trakt). Außerdem ist ihre Herstellung sehr aufwendig und teuer, so dass ein möglichst großer Anteil des verabreichten Medikaments auch zum Wirkungsort gelangen sollte. Darüber hinaus ist es für viele Anwendungen vorteilhaft, wenn der Wirkstoff nur einmalig verabreicht werden muss und über einen langen Zeitraum in geringen Dosen freigegeben wird. Als mögliche Beispiel seien hier entzündungshemmende Medikamente nach einer Operation oder immunsuppressive Medikamente nach einer Organtransplantation zu nennen, die außerdem nur lokal wirken sollen.[42,43] All diese Voraussetzungen können durch Hydrogele erfüllt werden. In ihm werden therapeutische Moleküle immobilisiert, die dadurch vom umgebenden Medium geschützt sind und kontrolliert wieder abgegeben werden. Im Rahmen des Sonderforschungsbereich 578 „Vom Gen zum Produkt“ ist der Projektbereich D1 „Drug Delivery Systeme für die kontrollierte Proteinfreisetzung“ zu

finden. Die Arbeitskreise Prof. Menzel (Institut für Technische Chemie) und Prof. Bunjes (Institut für Pharmazeutische Technologie) beschäftigen sich dabei mit der Herstellung und Charakterisierung von Hydrogelen für den Einsatz als DDS. Die dafür eingesetzten Polymere basieren auf Hydroxyethylstärke, die chemisch mit durch UV-Licht vernetzbaren Seitenketten modifiziert werden, so dass durch entsprechende Bestrahlung das Hydrogel entsteht.[44] Dieses zeichnet sich durch hohe Biokompatibilität sowie enzymatische Abbaubarkeit aus.[45] Die Freigabe der eingeschlossenen Moleküle erfolgt über enzymatischen Abbau oder Diffusion aus dem Hydrogel.[46] Durch Parametervariation lässt sich die Freigabekinetik der im Hydrogel inkorporierten Moleküle steuern. Zur Untersuchung der Freigabekinetik kommen vor allem Freisetzungsexperimente zum Einsatz, die bei den verwendeten Hydrogelen über ein Jahr lang dauern können und mit geringer Zuverlässigkeit behaftet sind.[47,48] An dieser Stelle kann mit der Zweiphotonen-Fluoreszenzmikroskopie eine detailliertere Charakterisierung der Hydrogele innerhalb kurzer Zeit erfolgen. Mithilfe von fluoreszierenden Proteinen ist es möglich, deren Rotations- und Translationsdiffusion im Hydrogel zu untersuchen und damit Aussagen über die Mobilität der Moleküle im Polymernetzwerk sowie Voraussagen über die Freisetzungskinetik zu treffen. Zur Untersuchung der Rotationsdiffusion wird die Fluoreszenzanisotropie der Moleküle gemessen; die Messung der Translationsdiffusion erfolgt über die Aufnahme der Fluoreszenzerholung nach Photobleichen (FRAP). Es ist möglich, beide Techniken hintereinander auf nur eine Hydrogelprobe mit nur minimalen Änderungen am Mikroskopaufbau anzuwenden. Dadurch können innerhalb kurzer Zeit wichtige Informationen zur Charakterisierung der synthetisierten Hydrogele auf molekularer Ebene erhalten werden, welches ein wichtiger Beitrag zur Etablierung der untersuchten Hydrogele als Drug Delivery System ist.

Diese Arbeit ist folgendermaßen strukturiert: Im theoretischen Teil werden wichtige Grundlagen zur Durchführung von Experimenten mit Multiphotonen-Fluoreszenzmikroskopie geschaffen. In dem anschließenden Methodenteil liegt der Fokus auf den experimentellen Aufbauten und Messprinzipien sowie wichtigen Aspekten der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe, als auch auf Details zur Probenherstellung. Das Kapitel „Ergebnisse und Diskussion“ ist in einen Teil zur Aminogruppenanalyse auf Polymeroberflächen und einen Teil zur Charakterisierung von Hydrogelen durch fluoreszierende Proteine gegliedert. Abschließend erfolgt die Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse sowie ein Ausblick auf mögliche zukünftige Experimente.

## Kapitel 2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

Für die erfolgreiche Durchführung der Experimente dieser Arbeit wird Wissen aus unterschiedlichen Bereichen der Naturwissenschaften und Technik benötigt. Neben der Funktionsweise und Eigenschaften von Lasern, Optiken und Mikroskopen bedarf es vor allem an Verständnis über die Chemie der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe und ihre Wechselwirkungen auf molekularer Ebene. Daneben gilt es auch fundamentale Zusammenhänge im Bereich der Plasmaphysik und der Polymerchemie zu durchdringen. Eine Behandlung all dieser Themen in diesem Kapitel würde über den Umfang dieser Arbeit weit hinausgehen. Daher soll der Fokus auf der Fluoreszenz von Molekülen liegen, da sie in dieser Arbeit die Schlüsselrolle spielt. Neben einer kurzen Beschreibung von Licht als elektromagnetische Welle (Kapitel 2.1) werden vor allem die Fluoreszenzanisotropie (Kapitel 2.4) und der Prozess der Fluoreszenzzerholung nach Photobleichen (Kapitel 2.5) als zwei spezielle Fluoreszenzanalysemethoden behandelt. Außerdem wird auch die Zweiphotonen-Fluoreszenzmikroskopie (Kapitel 2.3) diskutiert, da diese im Gegensatz zur Einphotonenmikroskopie noch nicht so stark etabliert ist.

### 2.1 Licht als elektromagnetische Welle

Um Licht physikalisch beschreiben zu können, wird ihm mal Wellencharakter, mal Teilchencharakter zugeschrieben (Welle-Teilchen-Dualismus). Es heißt, dass je langwelliger das Licht ist, desto stärker ist der Wellencharakter ausgeprägt (zum Beispiel Radiowellen), je kurzwelliger, desto stärker ist der Teilchencharakter (zum Beispiel Gammastrahlung). Zur Beschreibung der Eigenschaft von Licht im sichtbaren Bereich und dessen Wechselwirkung mit Materie sind beide Modelle notwendig. Die Beschreibung elektromagnetischer Strahlung ist durch die Maxwellschen Gleichungen gegeben. Dabei wird oft nur das elektrische Feld beschrieben, da das magnetische Feld senkrecht in gleicher Frequenz und Phase oszilliert.\* Der orts- und zeitabhängige Feldstärkevektor  $\vec{E}(\vec{z}, t)$  wird durch Gleichung (2-1) beschrieben. Dabei ist  $E_0$  die Amplitude der Welle,  $k$  ist Wellenvektor in Ausbreitungsrichtung,  $\omega$  die Kreisfrequenz der Modulation und  $z$  wird als Ausbreitungsrichtung definiert.

---

\* Dies gilt für unendlich lange Wellen in einem nicht absorbierenden Medium, aber zum Beispiel nicht für das Nahfeld eines strahlenden Dipols.



$$\begin{aligned}\vec{E}(\vec{z}, t) &= \vec{E}_0 \cdot e^{i(\omega t - \vec{k} \cdot \vec{z})} \\ &= \vec{E}_0 \left[ \cos(\omega t - \vec{k} \cdot \vec{z}) + i \sin(\omega t - \vec{k} \cdot \vec{z}) \right]\end{aligned}\quad (2-1)$$

In Kapitel 2.4 wird deutlich, dass die Polarisation des mit den Farbstoffen wechselwirkenden Lichts eine wichtige Rolle spielt. Sie ist als Schwingungsebene des elektrischen Feldvektors definiert. Thermische Lichtquellen sind unpolarisiert; die elektrischen Feldvektoren besitzen keine bevorzugte Orientierung. Laserquellen hingegen besitzen meist eine lineare Polarisierung, also eine Vorzugsrichtung. Daneben existiert auch zirkular polarisiertes Licht, wo der Feldvektor eine Kreisbahn beschreibt. Beide Polarisationsarten sind Spezialfälle des elliptisch polarisierten Lichts, das als Superposition zweier Wellen in  $x$ - und  $y$ -Richtung mit einer Phasendifferenz  $\varepsilon$  dargestellt werden kann.[49]

$$\vec{E}(z, t) = \vec{E}_x + \vec{E}_y = \begin{pmatrix} E_{0,x} \cos(\vec{k}z - \omega t) \\ E_{0,y} \cos(\vec{k}z - \omega t + \varepsilon) \\ 0 \end{pmatrix} \quad (2-2)$$

Bei der elliptischen Polarisation ändern sich Richtung und Stärke des Feldvektors mit der Zeit. Wenn die Amplituden der beiden Komponenten gleich groß sind ( $E_{0,x} = E_{0,y}$ ) und die Phasendifferenz  $90^\circ$  oder ein Vielfaches von  $2\pi$  beträgt ( $\varepsilon = \pi/2 + 2m\pi$ ,  $m \in \mathbb{Z}$ ), dann ergibt sich daraus eine zirkular polarisierte Welle. Man unterscheidet hier noch zwischen rechts- und linkszirkular polarisiertem Licht (Phasendifferenz gleich  $-\pi/2$  beziehungsweise  $+\pi/2$ ; diese Unterscheidung spielt in dieser Arbeit jedoch keine Rolle). Wenn die Phasendifferenz Null ist oder ein Vielfaches von  $2\pi$  beträgt, sind beide Komponenten in Phase und man beobachtet linear polarisiertes Licht. Die lineare Polarisation kann auch als Superposition von links- und rechtspolarisiertem Licht betrachtet werden. Zur praktischen Unterscheidung von horizontal und vertikal linear polarisiertem Licht ist es wichtig zu erwähnen, dass der eine Fall zum anderen sich durch eine Phasendifferenz von  $180^\circ$  ( $\varepsilon = (2m+1)\pi$ ,  $m \in \mathbb{Z}$ ) unterscheidet. Besitzen also bei horizontaler Polarisation die  $E_x$ - und  $E_y$ -Komponenten des Feldvektors die Phasenbeziehung  $0^\circ$  zueinander, dann ergibt sich bei der dazu senkrechten vertikalen Polarisation die Phasenbeziehung  $180^\circ$ . Die Bezeichnung horizontal und vertikal ist dabei nur eine Frage der Definition. Aus dieser Beschreibung lässt sich leicht verstehen, wie eine Polarisation in eine andere umgewandelt werden kann. Dies wird durch Wellen- beziehungsweise Verzögerungsplatten realisiert, die aus einem doppelbrechenden Material bestehen und dadurch eine Phasendifferenz zwischen den beiden Komponenten bewirken (siehe

Kapitel 3.3). Zur Veranschaulichung des Sachverhalts sei die frei erhältliche Software EMANIM empfohlen.[50]

Um die Wechselwirkung von elektromagnetischer Strahlung mit Materie zu beschreiben, muss noch die dielektrische oder auch induzierte Polarisation  $P$  eingeführt werden. Durch diesen Begriff wird die Ladungsverschiebung in einem nichtleitenden Material beschrieben. In einem linearen, isotropen dielektrischen Medium ist die Polarisation parallel und proportional zum elektrischen Feldvektor.

$$\vec{P} = \varepsilon_0 \cdot \chi \cdot \vec{E} \quad , \quad \chi = \varepsilon(\nu) - 1 \quad (2-3)$$

Die Größe  $\chi$  wird Suszeptibilität genannt und ist eine Materialeigenschaft, welche die Fähigkeit zur elektrischen Polarisierbarkeit ausdrückt. Sie steht in Relation zur frequenzabhängigen relativen Dielektrizitätskonstante  $\varepsilon$ . Bei hohen Feldstärken tritt eine Sättigung im Material auf, der Zusammenhang zwischen Feldstärke und Polarisation wird nichtlinear und die Suszeptibilität eine Funktion des Feldvektors. In einem optisch isotropen Medium lässt sich die Polarisation in einer Reihe entwickeln.[4]

$$\vec{P} = \varepsilon_0 \cdot \chi(\vec{E}) \cdot \vec{E} = \varepsilon_0 \left( \chi \vec{E} + \chi_2 \vec{E}^2 + \chi_3 \vec{E}^3 + \dots \right) \quad (2-4)$$

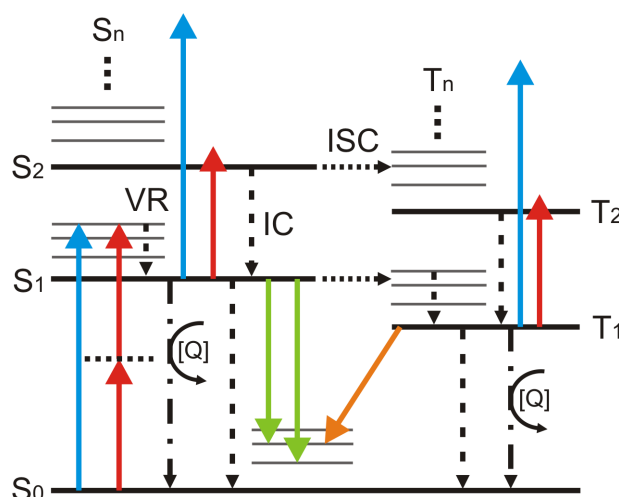
Die Suszeptibilitäten der Ordnung  $i$  sind Tensoren der Ordnung  $i+1$ ; dies soll hier nur der Vollständigkeit halber erwähnt und nicht weiter ausgeführt werden. Setzt man nun für den Vektor  $E$  den realen und zeitabhängigen Teil aus Gleichung (2-1) ein, so ergibt sich folgende Gleichung.

$$P = \varepsilon_0 \chi E_0 \cdot \cos \omega t + \frac{\varepsilon_0 \chi_2}{2} E_0^2 (1 - \sin 2\omega t) + \frac{\varepsilon_0 \chi_3}{4} E_0^3 (3 \cos \omega t - \cos 3\omega t) + \dots \quad (2-5)$$

Aus den höheren Termen lassen sich wichtige optische Phänomene wie die Erzeugung der Harmonischen einer Welle (Frequenzverdopplung oder -verdreifachung), Frequenzmischung oder auch Selbstfokussierung von Licht durch den Kerr-Effekt ableiten, wie er bei einem Titan-Saphir Laser zur Erzeugung von Femtosekundenpulsen zur Zweiphotonenanregung genutzt wird. Auch die Zweiphotonenabsorption ist ein nichtlinearer Prozess, bei dem der  $\chi_3$ -Term eine Rolle spielt. Da dies ein nichtparametrischer Prozess ist, müssen hierfür die komplexen Beiträge betrachtet werden.[51] In einem nichtparametrischen Prozess kann die Photonenenergie auf ein Material übertragen werden. Eine genauere Beschreibung des Phänomens soll in diesem Rahmen nicht erfolgen.

## 2.2 Absorption und Fluoreszenz

Auch wenn die Erläuterung der Fluoreszenz anhand des Jabłoński-Diagramms in gängigen Lehrbüchern zu finden ist, sollen die verschiedenen ablaufenden Prozesse hier kurz erklärt werden, da die Fluoreszenz erstens der zentrale Prozess dieser Arbeit ist und zweitens die Beschreibungen in Lehrbüchern oft nur einige Aspekte behandeln. Es sei darauf hingewiesen, dass ein Jabłoński-Diagramm nur ein vereinfachendes Schema ist, welches keinen Anspruch auf Vollständigkeit erheben kann.



**Abbildung 1:** Jabłoński-Diagramm für ein organisches Molekül mit einem Singulett-Grundzustand. Die vertikale Dimension repräsentiert die Energie des jeweiligen Zustands.

Die meisten organischen Moleküle befinden sich bei Raumtemperatur im Singulett-Grundzustand. Es wird nahezu ausschließlich der elektronische Grundzustand (S<sub>0</sub>) bevölkert, da die thermische Energie circa zwei Größenordnungen geringer ist als die Energielücke zum ersten angeregten Zustand. Durch Absorption eines Photons wird ein Elektron in einen energetisch angeregten Zustand (S<sub>1</sub>) befördert. Dabei bestimmen die Franck-Condon-Faktoren die Wahrscheinlichkeit für den Übergang. Aus den vibronisch angeregten Zuständen erfolgt eine schnelle Relaxation (VR) in den Schwingungsgrundzustand des angeregten Niveaus. Absorption und Schwingungsrelaxation erfolgen auf einer Zeitskala von Femtosekunden bis Picosekunden. Die Einphotonenabsorption (blauer Pfeil) ist ein resonanter Übergang. Die gleiche Anregung eines Moleküls kann auch mit zwei Photonen über ein intermediäres Zwischenniveau erfolgen. Dieses ist sehr kurzlebig, so dass die Absorption des zweiten Photons innerhalb weniger Femtosekunden erfolgen muss.[52] Die Energie des angeregten Elektrons setzt sich additiv aus der Energie der beiden absorbierten Photonen zusammen.

$$E = h\nu_1 + h\nu_2 = hc \left( \frac{1}{\lambda_1} + \frac{1}{\lambda_2} \right) \quad (2-6)$$

Aus dem ersten angeregten Zustand kann das Molekül über verschiedene Wege wieder in den elektronischen Grundzustand gelangen. Der erwünschte und zu beobachtende Prozess ist die Emission eines Photons, die man als Fluoreszenz detektiert. Auch hier spielen die Franck-Condon Faktoren eine Rolle, so dass eine effektive Relaxation meist in schwingungsangeregte Zustände des elektronischen Grundzustands erfolgt. Aufgrund dessen ist die Fluoreszenz bei einer Einphotonenabsorption immer längerwelliger als die Wellenlänge der Anregung (Stokes-Verschiebung); für einen Zweiphotonenprozess ist eine generelle Aussage nicht möglich. Konkurrenzprozesse zur Fluoreszenz sind die Dissipation der Anregungsenergie in Wärme (innere Konversion, IC) oder die Fluoreszenzlöschung durch Stoß mit einem Quenchemolekül Q. Daneben kann eine Spinumkehr des angeregten Elektrons durch Intersystemcrossing (ISC) erfolgen, so dass das Molekül dann in einem Triplettzustand T vorliegt. Der quantenmechanisch eigentlich verbotene Prozess kann durch Spin-Bahn-Kopplung in großen Molekülen oder durch Präsenz von schweren Atomen (ab dritter Periode) erfolgen. Nach der Hundschen Regel ist der Triplettzustand energetisch niedriger gelegen als der Singulettzustand, so dass der Umkehrprozess zwar stattfinden kann, aber energetisch ungünstig ist. Da der Übergang aus dem Triplettzustand in den elektronischen Grundzustand, der aufgrund des Pauliverbots nur ein Singulettzustand sein kann, spinverboten ist, besitzt der Triplettzustand eines Moleküls eine deutlich längere Lebensdauer als der angeregte Singulettzustand (typisch  $\mu\text{s}$ -s im Vergleich zu ns). Bei der Emission eines Photons aus dem Triplettzustand spricht man von Phosphoreszenz, die aufgrund des niedriger liegenden Energieniveaus langwelliger als die Fluoreszenz ist. Natürlich können auch aus dem Triplettzustand innere Konversion und Fluoreszenzlöschung stattfinden. Aus den ersten angeregten elektronischen Niveaus kann Absorption von Photonen in höher liegende Niveaus erfolgen, aus denen aber im Allgemeinen keine Fluoreszenz oder Phosphoreszenz beobachtet wird, da diese Zustände schnell durch innere Konversion in den ersten angeregten elektronischen Zustand relaxieren. Durch die Anregungsenergie sind die Moleküle in elektronisch angeregten Zuständen reaktiver als im Grundzustand und können somit leicht Photoreaktionen eingehen, die dann oft zu nicht-fluoreszierenden Produkten führen. Man spricht in diesem Fall von Photobleichen, welches in Kapitel 2.5 näher behandelt wird. Ist die Anregungsenergie groß genug, so kann ein Molekül auch ionisiert werden. Neben den hier aufgeführten Zuständen sind noch weitere Niveaus für manche Moleküle möglich wie zum Beispiel Charge-Transfer Komplexe, die aber zu speziell für eine allgemeine Behandlung an dieser Stelle sind.

Damit ein Elektronenübergang stattfinden kann, muss allgemein die Gleichung (2-7) erfüllt sein. Sie sagt aus, dass ein Operator  $\hat{p}$  angewendet auf ein Molekül im Anfangszustand mit

der Wellenfunktion  $\Psi_i$  und einem Endzustand mit der Wellenfunktion  $\Psi_j$  eine von Null verschiedene Wahrscheinlichkeitsamplitude besitzen muss.

$$M_{ij} = \langle \Psi_j | \mathbf{p} | \Psi_i \rangle \neq 0 \quad (2-7)$$

Für eine Einphotonenanregung ist  $\mathbf{p}$  das permanente Dipolmoment des Moleküls und  $M_{ij}$  das Übergangsdipolmoment. Beide Größen sind Vektoren beziehungsweise Tensoren erster Ordnung. Für eine Zweiphotonenabsorption sind die Größen  $\mathbf{p}$  und  $M_{ij}$  Matrizen beziehungsweise Tensoren zweiter Ordnung. Der Operator  $\mathbf{p}$  ist über den Polarisierbarkeitstensor  $\alpha$  verknüpft.

$$\mathbf{p} = \alpha \vec{E} \quad (2-8)$$

Die Stärke des Übergangs ist gegeben durch das Quadrat des Skalarprodukts der Größe  $M_{ij}$  und dem elektrischen Feldvektor.

$$\sigma \propto |\mathbf{M}_{ij} \cdot \vec{E}|^2 \quad (2-9)$$

Die Größe  $\sigma$  ist der Absorptionsquerschnitt des Moleküls bei einer bestimmten Wellenlänge  $\lambda$  des elektrischen Feldes  $E$ . Eine alternative Beschreibung geht über den Zweiphotonenabsorptionstensor  $\mathbf{S}$ . Gleichung (2-9) geht damit über in:

$$\sigma \propto |\vec{E} \cdot \mathbf{S} \cdot \vec{E}|^2. \quad (2-10)$$

Für eine genauere Beschreibung der Zweiphotonenabsorption sei auf die entsprechende Literatur verwiesen.[53–56]

Ob die möglichen Übergänge von dem elektronischen Grundzustand in den angeregten Zustand erlaubt sind, also ob Gleichung (2-7) ungleich Null ist, hängt von der Symmetrie der Wellenfunktion im Anfangs- und Endzustand ab. Aus gruppentheoretischen Überlegungen leiten sich die Auswahlregeln ab. Neben der Drehimpulserhaltung ist vor allem die Laporte-Regel für zentrosymmetrische Moleküle sowie die Pseudoparitätsregel für Moleküle mit  $C_{2v}$ - oder geringerer Symmetrie wichtig.[57]

**Tabelle 1:** Gegenüberstellung wichtiger Auswahlregeln für elektronische Übergänge durch Einphotonenabsorption (EPA) und Zweiphotonenabsorption (ZPA). Die Symbole u, g, + und – kommen aus der Mulliken-Notation (Symmetrieklassifizierung). Bei ZPA ist  $\pm 1$  nur für zwei unterschiedliche Photonen möglich.

	EPA	ZPA
<b>Drehimpulserhaltung</b>	$\Delta J = 0, \pm 1$	$\Delta J = 0, \pm 1, \pm 2$
<b>Paritäts-/Laporte-Regel</b>	$u \leftrightarrow g$	$g \leftrightarrow g, u \leftrightarrow u$
<b>Pseudoparitätsregel</b>	$+ \leftrightarrow -$	$+ \leftrightarrow +, - \leftrightarrow -$

Für große Moleküle sind die Auswahlregeln aufgrund vibronischer Kopplung, die die Symmetrie des Moleküls erniedrigen, nicht so streng, so dass auch verbotene Übergänge schwach erlaubt sein können.

Die Population eines angeregten Zustands kann über eine Ratengleichung beschrieben werden. Vereinfacht wird hier von einem Zwei-Niveau-System ausgegangen.

$$\frac{dN_{S_1}}{dt} = k_{\uparrow} \cdot N_{S_0} - \sum_i k_{\downarrow, i} \cdot N_{S_1} \quad (2-11)$$

Hierbei ist  $N$  die Besetzungszahl der Zustände,  $k_{\uparrow}$  die Geschwindigkeitskonstante, die den angeregten Zustand bevölkert und  $k_{\downarrow}$  sind die Geschwindigkeitskonstanten, die den angeregten Zustand entvölkern. Für die Einphotonenabsorption ist die Geschwindigkeitskonstante proportional zur Intensität des eingestrahlteten Licht, für die Zweiphotonenabsorption hingegen ist sie quadratisch abhängig.

$$\begin{aligned} k_{\text{EPA}} &= \sigma^{(1)} \cdot I \\ k_{\text{ZPA}} &= \sigma^{(2)} \cdot I^2 \end{aligned} \quad (2-12)$$

Die Größe  $\sigma^{(n)}$  ist der in Gleichung (2-9) eingeführte Absorptionsquerschnitt. Für Einphotonenabsorption liegen Absorptionsquerschnitte in der Größenordnung von  $10^{-16} \text{ cm}^2$ , für die Zweiphotonenabsorption bei  $10^{-49} \text{ cm}^4 \cdot \text{s} \cdot N_{\text{Photon}}^{-1}$ . [52] Zu Ehren der theoretischen Vorhersage der Zweiphotonenabsorption von Maria Göppert-Mayer [13] ist die Einheit GM für  $10^{-50} \text{ cm}^4 \cdot \text{s} \cdot N_{\text{Photon}}^{-1}$  üblich. Es gilt hierbei zu beachten, dass in der Literatur oft Zweiphotonenwirkungsquerschnitte (*action cross-section*) angegeben sind, die das Produkt des Zweiphotonenabsorptionsquerschnitts  $\sigma^{(2)}$  mit der Quantenausbeute  $\Phi$  (siehe Gleichung (2-14)) sind. Beide Größen besitzen die gleiche Einheit und oft wird die Unterscheidung nicht explizit vollzogen, so dass Verwechslungen leicht zustande kommen können.

Das Elektron im angeregten Zustand besitzt eine gewisse Lebensdauer, wobei der Relaxationszeitpunkt eines einzelnen Moleküls vollkommen zufällig ist. Ein Ensemble von Molekülen gehorcht einem exponentiellen Zerfallsgesetz, welches auch die Lösung der Differentialgleichung (2-11) bei alleiniger Betrachtung eines Entvölkerungsprozesses, nämlich der Fluoreszenz, ist und der Randbedingung, dass alle Moleküle zum Zeitpunkt  $t = 0$  angeregt worden sind.

$$N_{S_1} = N_{S_1,0} \cdot e^{-k_F t} = N_{S_1,0} \cdot e^{-\frac{t}{\tau_0}} \quad (2-13)$$

Hierbei ist  $N_{S_1,0}$  die Besetzungszahl des  $S_1$ -Zustands zum Zeitpunkt Null und  $k_F$  die Geschwindigkeitskonstante der Entvölkerung durch Fluoreszenz. Die inverse Zahl ist als natürliche Lebensdauer  $\tau_0$  definiert. Sie gibt die Zeit an, nach der noch  $1/e \approx 37\%$  der ursprünglichen Anzahl von Molekülen im angeregten Zustand sind. Wie aber bereits im Jabłoński-Diagramm (Abbildung 1) und aus Gleichung (2-11) ersichtlich, existieren neben der Fluoreszenz noch weitere Prozesse zur Entvölkerung des angeregten Zustands. Sie werden als nicht-radiative Prozesse zusammengefasst. Somit wird nur ein Teil der absorbierten Photonen wieder emittiert; dieser Anteil wird als Quantenausbeute  $\Phi$  bezeichnet.

$$\Phi = \frac{N_{\text{Photon,emittiert}}}{N_{\text{Photon,absorbiert}}} = \frac{k_F}{k_F + \sum k_{nr}} = \frac{\tau}{\tau_0} \quad (2-14)$$

Die Größe  $\tau$  ist damit die tatsächlich beobachtbare Fluoreszenzlebensdauer. Unter Berücksichtigung der Proportionalität von  $N$  zur beobachteten Fluoreszenzintensität  $F$  geht Gleichung (2-13) in Gleichung (2-15) über.

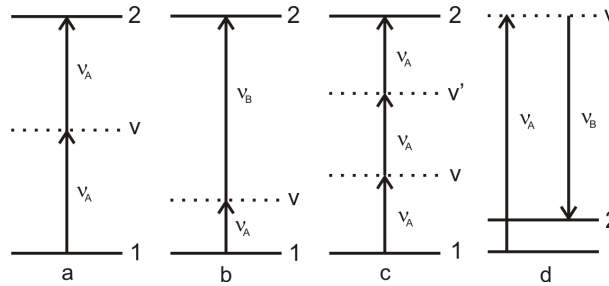
$$F(t) = \sum_i F_i \cdot e^{-\frac{t}{\tau_i}} \quad (2-15)$$

Die gemessene Fluoreszenzabklingkurve  $F(t)$  kann sich additiv aus mehreren Komponenten zusammensetzen, die entweder durch verschiedene Fluorophore oder verschiedene Mikroumgebungen des Fluorophors im Detektionsvolumen zustande kommt oder auch durch verschiedene angeregte Zustände des Moleküls entsteht (Kapitel 3.6).

## 2.3 Zweiphotonenfluoreszenzmikroskopie

Die Zweiphotonenabsorption gehört in die Klasse der nichtlinearen Multiphotonenprozesse und unterscheidet sich deutlich von der linearen Einphotonenabsorption. Die Beobachtung von Multiphotonenprozessen ist im Allgemeinen experimentell aufwendiger, dafür ergeben sich hieraus auch Vorteile oder auch weitere Informationen über die zu untersuchenden

Moleküle, die durch Einphotonenabsorption nicht zugänglich sind.[53,56,58] Verschiedene Multiphotonenprozesse sollen hier kurz gegenübergestellt werden.



**Abbildung 2:** Energieschemadiagramm verschiedener Multiphotonenprozesse. Durchgezogene Linien sind resonante Niveaus, gestrichelte Linien virtuelle, beziehungsweise intermediäre Niveaus. Dargestellt sind a) Ein-Farben-Zweiphotonenabsorption, b) Zwei-Farben-Zweiphotonenabsorption, c) Dreiphotonenabsorption, d) Raman-Streuung.

Zweiphotonenabsorption kann prinzipiell durch zwei Photonen unterschiedlicher Energie (b) erfolgen, die sogenannte Zwei-Farben-Zweiphotonenabsorption.[59] Experimentell ist die in dieser Arbeit ausschließlich verwendete Ein-Farben-Zweiphotonenabsorption (a) jedoch leichter zu realisieren. Da die virtuellen Niveaus sehr kurzlebig und die Übergänge daher entsprechend unwahrscheinlich sind,[52] werden hohe Spitzenleistungen benötigt. Diese sind nur durch gepulste Laser zu realisieren. Bei einem Zwei-Farben-Experiment müssen die Pulse der beiden Farben zeitlich synchronisiert sein, während bei der Ein-Farben-Zweiphotonenabsorption beide Photonen aus demselben Puls kommen. Auch eine Dreiphotonenabsorption (c) wurde schon experimentell realisiert,[60] die theoretisch auch mit Photonen unterschiedlicher Energie erreicht werden kann. Da hier die Anregung über zwei virtuelle Niveaus geht, ist der Prozess aber noch unwahrscheinlicher als eine Zweiphotonenabsorption. Auch die Raman-Streuung (d) ist ein Zweiphotonenprozess, der über ein nichtresonantes Zwischen-niveau läuft, sie gehört allerdings nicht zur Multiphotonenabsorption. Weiterhin ist Multiphotonenabsorption auch über resonante Zwischenniveaus möglich (nicht gezeigt), wie sie zum Beispiel in Lanthanid-haltigen Nanopartikeln genutzt wird.[61] Die letzten beiden genannten Prozesse können auch mit Lasern im kontinuierlichen Betrieb (*continuous wave*, cw) betrieben werden.

Die Zweiphotonen-Fluoreszenzmikroskopie ist vom Prinzip her der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) zuzuordnen, sie wurde erstmalig von Denk, Strickler und Webb realisiert.[12] Konfokal bedeutet, dass Anregung und Fluoreszenz den gleichen optischen Weg gehen. Praktisch heißt das, dass mit dem Mikroskopobjektiv der Laser auf die Probe fokussiert wird und die Fluoreszenz aus diesem Fokaltvolumen mit dem Objektiv gesammelt wird. Ein Strahlteiler in Form eines dichroitischen Spiegels trennt Anregungs- und Emissionslicht voneinander.

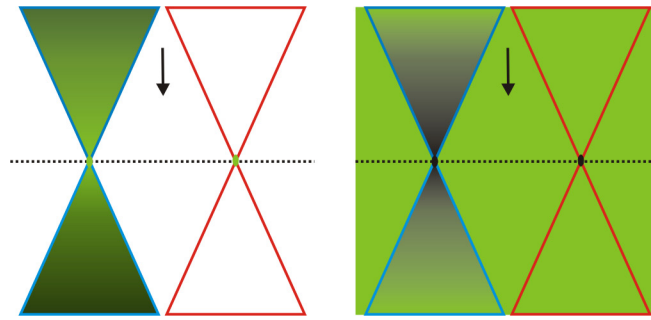


Als Anregungsquelle wird häufig ein Titan-Saphir-Laser (Ti:Sa) verwendet. Das aktive Lasermedium sind dabei  $\text{Ti}^{3+}$ -Ionen auf  $\text{Al}^{3+}$ -Plätzen im  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$  Kristall. Der Ti:Sa-Laser zeichnet sich aufgrund des breiten Fluoreszenzspektrums des Titans durch einen sehr hohen Durchstimmbarkeitsbereich von je nach Ausführung etwa 650 nm bis 1100 nm aus. Gemäß Gleichung (2-6) sind über eine Zweiphotonenanregung Energieniveaus erreichbar, die einer Einphotonenabsorption im Bereich 325-550 nm entsprechen. Somit sind praktisch alle organischen Fluorophore durch einen Ti:Sa-Laser anregbar. Durch passive Modenkopplung werden Laserpulse mit einer Pulsdauer von typischerweise 100-200 fs erzeugt, wodurch eine sehr hohe zeitliche Auflösung molekularer Prozesse ermöglicht wird. Solche kurze Pulse werden außerdem benötigt, um eine effektive Zweiphotonenanregung zu ermöglichen, da die mittlere Fluoreszenzintensität  $\langle F(t) \rangle$  invers proportional zur Pulsbreite  $\Delta t$  ist.[62] So können durch Spitzenleistungen von  $\text{GW}\cdot\text{cm}^{-2}$  bis  $\text{TW}\cdot\text{cm}^{-2}$  hohe Fluoreszenzintensitäten von zum Beispiel  $10^6$  Photonen pro Sekunde aus einem Volumen von weniger als einem Femtoliter bei einer mittleren Leistung von wenigen mW erreicht werden.[63]

$$\langle F(t) \rangle \approx \frac{1}{2} EC \Phi \sigma^{(2)} \frac{g}{f \cdot \Delta t} \frac{8n \langle P(t) \rangle^2}{\pi \lambda} \quad (2-16)$$

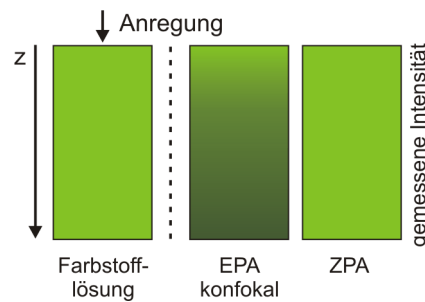
In einem konkreten Experiment sind die Detektionseffizienz  $E$ , die Fluorophorkonzentration  $C$ , Anregungswellenlänge  $\lambda$ , Absorptionsquerschnitt  $\sigma^{(2)}$  und Quantenausbeute  $\Phi$  sowie der Brechungsindex  $n$  feste Größen. Auch der Parameter der Pulsform  $g$  sowie die Pulswiederholrate  $f$  sind feste apparative Größen. Die variierbare mittlere Leistung  $\langle P(t) \rangle$  ist eine wichtige Größe, da sie quadratisch in die Gleichung eingeht. Jedoch bestimmt sie auch den thermischen Energieeintrag in die Probe. Außerdem besitzen Bleichprozesse bei Multiphotonenanregung zum Teil eine Leistungsabhängigkeit höherer Potenz und nehmen dadurch mit höherer Leistung überproportional zu, so dass bei der Leistungsvariation Grenzen gesetzt sind.

Die in Gleichung (2-12) und (2-16) gezeigte quadratische Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der eingestrahnten Laserintensität bringt den Vorteil einer intrinsischen 3D-Auflösung für die Zweiphotonenmikroskopie mit sich, so wie sie in Abbildung 3 schematisch skizziert ist.



**Abbildung 3:** Gegenüberstellung von Einphotonen- und Zweiphotonenanregung bei der intrinsischen 3D-Auflösung (links) und dem Photobleichen (rechts).

Der Laserstrahl kommt von oben in eine Probe und wird durch eine Linse fokussiert. Die gestrichelte Linie ist dabei die Fokalebene, die rote und blaue Linie stellen die räumliche Begrenzung des Laserstrahls dar. Aufgrund des hohen Absorptionsquerschnitts für die Einphotonenabsorption wird auch bei niedriger Photonenflussdichte Fluoreszenz beobachtet, so dass im gesamten Doppelkegelvolumen Anregung stattfindet (Abbildung 3 links). Um Zweiphotonenabsorption wahrscheinlich zu machen, bedarf es neben der zeitlichen Kompression durch Laserpulse auch einer räumlichen Kompression. So wird nur direkt im Fokuspunkt zweiphotoneninduzierte Fluoreszenz beobachtet. Damit lässt sich eine Probe mit dem Laserstrahl dreidimensional abrastern. Um eine vergleichbar gute räumliche Auflösung bei Einphotonenanregung zu erhalten, muss bei der Detektion der Fluoreszenz vor dem Detektor eine Lochblende eingefügt werden, so dass ein Großteil der Fluoreszenz außerhalb der Fokalebene geblockt und die Fluoreszenz dadurch räumlich aufgereinigt wird. Dadurch kann aber ein Großteil der erzeugten Fluoreszenz nicht genutzt werden. Ein weiterer Nachteil der Einphotonenanregung ergibt sich bei optisch dichten Proben. Bei der dreidimensionalen Abrasterung der Probe muss der Laserstrahl in größeren Tiefen eine längere Strecke durch die Probe laufen und wird dadurch schon zum Teil absorbiert, was in einer falsch niedrigeren gemessenen Fluoreszenzintensität resultiert. Mathematisch ausgedrückt ist bei einem Konzentrationsprofil  $c(z) = \text{const.}$  die Intensität für Zweiphotonenmikroskopie in erster Näherung  $F(z) = \text{const.}$ , während für Einphotonenmikroskopie das Intensitätsprofil tiefenabhängig ist,  $F(z) = f(z)$ . [64] Dieser Sachverhalt ist auch in Abbildung 4 illustriert.



**Abbildung 4:** Unterschiede für EPA und ZPA im gemessenen Intensitätsprofil in Abhängigkeit von der Tiefe für eine Probe homogener Farbstoffkonzentrationsverteilung.

Als weitere Konsequenz aus der intrinsischen 3D-Auflösung ergibt sich, dass bei der Zweiphotonenmikroskopie Photobleichen nur im Fokuspunkt stattfindet, also dort, wo auch die Fluoreszenz detektiert wird. Bei der Einphotonenmikroskopie findet das Bleichen im gesamten Anregungsvolumen statt (vergleiche Abbildung 3 rechts). Wird die Probe nun Schicht für Schicht abgerastert (optische Schnitte), so ergeben sich bei zeitlich später aufgenommenen Schichten durch das vorhergegangene Bleichen falsch niedrigere Intensitäten. Allerdings ist das Photobleichen im Fokuspunkt bei gleicher Fluoreszenzintensität bei Zweiphotonenanregung höher, was vor allem den hohen Spitzenleistungen in den Pulsen zuzuschreiben ist. Neben der intrinsischen 3D-Auflösung ergeben sich noch weitere positive Aspekte durch die Verwendung von Nahinfrarotlicht (NIR). Im NIR sind fast alle organischen Proben transparent. Die Energie der Photonen ist zu niedrig für eine resonante elektronische Anregung der Moleküle und zu hoch für eine Anregung von Grundswingungsbanden. In diesem Bereich sind vor allem die viel schwächeren Obertöne von Schwingungsbanden zu finden, erwähnenswert ist der Oberton  $2\nu_1 + \nu_3$  von Wasser bei 975 nm.[65] Außerdem ist die Streuung von NIR-Licht geringer als für sichtbares Licht beziehungsweise UV-Licht. Die Wellenlängenabhängigkeit der Stärke der Streuung ist stark vom Partikeldurchmesser  $d$  der streuenden Moleküle abhängig. Während für  $d \approx \lambda$  nur eine geringe bis keine Wellenlängenabhängigkeit gefunden wird (Mie-Streuung), so wird für  $d \ll \lambda$  eine Wellenlängenabhängigkeit bis zur Inversen der vierten Potenz gefunden (Rayleigh-Streuung). Bei angenommenen Resonanzfrequenzen der Moleküle im fernen UV für die die Fluorophore umgebende Matrix ergibt sich für die Zweiphotonenanregung eine 16-fach geringere Streuung als für die energieäquivalente Einphotonenanregung. Darüber hinaus lässt sich bei Zweiphotonenanregung die Fluoreszenz leichter vom Anregungslicht spektral trennen. Viele Farbstoffe besitzen eine Stokes-Verschiebung von nur einigen 10 nm, bei der äquivalenten Zweiphotonenanregung liegen oft mehr als 100 nm zwischen Emissionsmaximum und Anregungswellenlänge des Lasers. Dadurch lassen sich oft bessere Verhältnisse von Signal zu Hintergrund erreichen.

Ein wichtiger Aspekt bei der Mikroskopie ist die optische Auflösung. Zum einen lässt sich das Anregungslicht nicht beliebig schmal fokussieren. Es ergibt sich ein Strahlradius  $\omega_{\min}$ , der proportional zur Wellenlänge und invers proportional zum Öffnungswinkel  $\Theta$  ist.

$$\omega_{\min} \approx \frac{2\lambda}{\pi \Theta} \quad (2-17)$$

Doch selbst wenn sich im Fokalkvolumen nur ein Fluorophor befindet, das man als Punktquelle annähern kann, so kann dieses nicht als Punkt abgebildet werden, sondern ist beugungslimitiert. Man nennt dies Punktantwortfunktion oder im Englischen *point spread function* (PSF). Das Beugungsmuster in der lateralen Ebene wird durch eine Airy-Scheibe in der Gleichung (2-18) beschrieben mit  $J_1$  als Bessel-Funktion erster Art und erster Ordnung.

$$I(r) = I_{r=0} \left( \frac{J_1(2\pi r)}{\pi r} \right)^2 \quad (2-18)$$

Das Auflösungsvermögen zweier Objekte unterhalb des Auflösungslimit ist dadurch definiert, dass das Beugungsmaximum des ersten Objekts gerade in das erste Beugungsminimum des zweiten Objekts fällt. Bei einer unendlichen Optik, das heißt die Strahlen laufen hinter dem Objektiv parallel, ergibt sich der minimal auflösbare Abstand  $\omega_r$  in lateraler Ebene zu:

$$\omega_r = \frac{1.22\lambda}{2n \cdot \sin \alpha} = \frac{0.61\lambda}{NA} \quad (2-19)$$

Diese Auflösungsgrenze ist eine Definition und wird Rayleigh-Kriterium genannt. Die Auflösung eines Mikroskops ist daher einerseits durch die verwendete Wellenlänge bestimmt, zum anderen durch die numerische Apertur  $NA$  des Objektives, also dem Produkt von Brechungsindex  $n$  und halben Öffnungswinkel  $\alpha$ . Für die Zweiphotonenabsorption gelten modifizierte Formeln, vor allem da hier die Fluoreszenzintensität gemäß Gleichung (2-12) und (2-16) quadratisch von der eingestrahlten Intensität abhängt und somit die quadrierte PSF ( $PSF^2$ ) relevant wird.[66]

$$\begin{aligned} \omega_r &= \frac{0.325\lambda}{\sqrt{2} \cdot NA^{0.91}}, NA > 0.7 \\ \omega_z &= \frac{0.325\lambda}{\sqrt{2}} \left( \frac{1}{n - \sqrt{n^2 - NA^2}} \right) \end{aligned} \quad (2-20)$$

Die Größe  $\omega_r$  und  $\omega_z$  definieren damit die minimal erreichbare laterale beziehungsweise axiale Auflösung. Sie entsprechen dem  $1/e$ -Wert einer an die  $PSF^2$  angepassten Gauß-

Funktion. Oft wird aber auch die volle Halbwertsbreite (FWHM) als Auflösung angegeben, welche sich durch Multiplikation mit dem Faktor  $2\sqrt{\ln 2}$  ergibt.

## 2.4 Fluoreszenzanisotropie

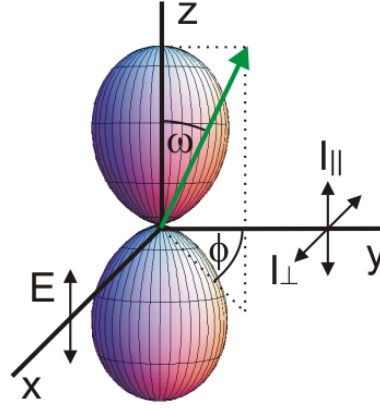
Über die Messung der zeitlich aufgelösten Fluoreszenzanisotropie erhält man zusätzliche Informationen über das zu untersuchende Molekül. Die theoretischen Grundlagen hierzu sind von Lakowicz detailliert behandelt worden.[67] Die Definition der Anisotropie  $r$  ist in Gleichung (2-21) gegeben. Dabei wird die Intensität der Fluoreszenz parallel und senkrecht zur Anregungspolarisation in z-Richtung gemessen, davon die Differenz gebildet und in Relation zur Gesamtfluoreszenz in alle drei Raumrichtungen gesetzt.\*

$$r = \frac{I_z - I_y}{I_z + I_y + I_x} = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (2-21)$$

Wenn Licht mit Materie wechselwirkt, so geschieht dies mit einer Winkelabhängigkeit zwischen Schwingungsrichtung (Polarisation) der elektrischen Komponente des Lichts und Lage des Übergangsdipolmoments des Moleküls. Hierzu wird oft die Analogie der molekularen Antenne benutzt; eine effektive Wechselwirkung, in diesem Fall die Absorption eines Photons, findet nur statt, wenn Strahlung und Antenne parallel zueinander stehen. In einer Farbstofflösung sind die Moleküle isotrop und statistisch in alle Raumrichtungen verteilt. Kommt es nun durch einen Anregungspuls zur Wechselwirkung von Licht und Materie, so ergibt sich im Mittel über viele Moleküle eine winkelabhängige Wahrscheinlichkeitsverteilung der Anregung, die sogenannte PhotoSelektion. Sie ist in Abbildung 5 als 3D-Plot für eine Einphotonenanregung gezeigt. Die PhotoSelektion der Moleküle ist radialsymmetrisch zur Polarisationsachse  $z$  und ist die Projektion des Quadrats des Anregungsvektors auf die  $y$ -Achse. Zur mathematischen Verdeutlichung sei zuerst einmal nur die Lage eines einzelnen Übergangsdipolmoments betrachtet (grüner Pfeil in Abbildung 5).

---

\* Bei der Beschreibung der Fluoreszenzanisotropie hat sich eine andere Achsenbezeichnung als bei der Beschreibung elektromagnetischer Wellen eingebürgert; hier ist  $x$  die Ausbreitungsrichtung des Lichts und  $z$  die molekulare Achse.



**Abbildung 5:** Koordinatensystem zur theoretischen Herleitung der Fluoreszenzanisotropie und Darstellung der Photoselektion von Molekülen in einem isotropen Medium durch linear polarisierte Anregung.

Durch das in Abbildung 5 definierte Koordinatensystem ergibt sich die Projektion des grünen Vektors auf die Detektionsachsen  $I_{||}$  und  $I_{\perp}$  zu:

$$\begin{aligned} I_{||}(\omega, \phi) &= \cos^2 \omega \\ I_{\perp}(\omega, \phi) &= \sin^2 \omega \cdot \sin^2 \phi \end{aligned} \quad (2-22)$$

Für ein einzelnes Molekül ergibt sich ein definierter Winkel  $\omega$  und  $\phi$ . Für ein Ensemble von Molekülen mit isotroper Verteilung wird man hingegen einen Mittelwert beobachten. Zuerst einmal haben alle Moleküle mit einem bestimmten Winkel  $\omega$  zur  $z$ -Achse und einen beliebigen Winkel  $\phi$  die gleiche Wahrscheinlichkeit angeregt zu werden. Eine Mittelung über alle Winkel  $\phi$  ergibt:

$$\begin{aligned} I_{||}(\omega, \phi) &= \cos^2 \omega \\ I_{\perp}(\omega, \phi) &= \frac{1}{2} \sin^2 \omega \end{aligned} \quad (2-23)$$

Nun betrachtet man noch die Verteilung angeregter Moleküle mit einem Winkel  $\omega$  zur  $z$ -Achse entsprechend ihrer Anregungswahrscheinlichkeit  $f(\omega)$ . Die Verteilungsfunktion lautet  $\cos^{2n} \omega \cdot \sin \phi$ , wobei  $n$  die Anzahl der involvierten Photonen der Anregung ist; sie ist Abbildung 5 als  $\cos^2$ -Funktion in Polarkoordinaten dargestellt. Die Photoselektion ist für Multiphotonenanregung höher als für Einphotonenanregung, da jede Interaktionen des Moleküls mit der Strahlung eine Selektion zur Folge hat und dementsprechend bei den Folgeschritten bereits vorselektiert sind. Die Integration des Produkts der Formel aus Gleichung (2-23) mit der Verteilungsfunktion  $f(\omega)$  über alle Winkel von 0 bis  $\pi/2$  ergibt die gleichen Argumente als Mittelwert. Eingesetzt in Gleichung (2-21) ergibt sich als Limit für die maximal erreichbare Anisotropie von isotrop verteilten Molekülen

$$r_0 = \frac{3\langle \cos^{2n} \omega \rangle - 1}{2} . \quad (2-24)$$

Die Berechnung des Mittelwerts für  $\langle \cos^{2n} \omega \rangle$  erfolgt über die Integration aller Winkel von 0 bis  $\pi/2$ . Für die Einphotonenanregung ergibt sich mit  $n = 1$  der Mittelwert zu  $3/5$  und somit ein  $r_0$ -Limit von  $2/5$ , für die Zweiphotonenanregung mit  $n = 2$  wird das Limit hingegen  $4/7$ . Diese Maximalwerte werden nur erreicht, wenn Absorptions- und Emissionsdipol kollinear sind.\* Sollten zwischen diesen ein von Null verschiedener Winkel  $\beta$  liegen, so reduziert sich die maximal messbare Anisotropie zu

$$r_0 = \frac{3\langle \cos^{2n} \omega \rangle - 1}{2} \cdot \frac{3 \cdot \cos^2 \beta - 1}{2} = \frac{2n}{2n+3} \cdot \frac{3 \cdot \cos^2 \beta - 1}{2} . \quad (2-25)$$

Je nach der relativen Lage des Emissionsdipols wird die maximal messbare Anisotropie verringert. Sie wird Null für den magischen Winkel von  $54.7^\circ$ . Bei Werten größer dem magischen Winkel ist eine negative Anisotropie messbar; sie ist maximal für  $\beta = 90^\circ$  mit  $r_0 = -n/_{2n+3}$ . Eine gute graphische Darstellung des Sachverhalts ist in der Arbeit von Denicke zu finden.[56] Während die Lage des Emissionsdipols ein statischer Faktor zur Verringerung der maximal messbaren Anisotropie ist, gibt es auch dynamische Faktoren, welche die zu beobachtende Fluoreszenzanisotropie mit der Zeit zunehmend depolarisieren. Ein Faktor ist resonanter Energietransfer, da bei dem Energieübertrag vom einem zum anderen Fluorophor keine Winkelabhängigkeit der Übertragungseffizienz existiert und die Photoselektion damit reduziert wird. Dies tritt jedoch nur unter bestimmten Voraussetzungen auf. Weitaus wichtiger ist die Depolarisation der Fluoreszenzanisotropie durch Rotationsdiffusion. Diese ist der Brownschen Molekularbewegung zuzuordnen;[68] also ein rein statistischer Prozess initiiert durch Stöße von Molekülen und nicht zu verwechseln mit der freien Eigenrotation der Moleküle. Da der Prozess kontinuierlich mit immer gleichem Ausmaß abläuft, zeigt ein Ensemble mit einem  $\delta$ -Puls angeregter Moleküle einen exponentiellen Abfall.

$$r(t) = r_0 \cdot \sum_i g_i \cdot e^{-\frac{t}{\theta_i}} , \quad \sum_i g_i = 1 \quad (2-26)$$

Alternativ ist auch die äquivalente Form in Gleichung (2-27) verbreitet.

---

\* Bei der Zweiphotonenanregung ist der Sachverhalt eigentlich komplexer, da es kein Übergangsdipolmoment gibt, sondern einen Absorptionstensor.

$$r(t) = \sum_i r_{0,i} \cdot e^{-\frac{t}{\theta_i}}, \quad \sum_i r_{0,i} = r_0 \quad (2-27)$$

Hierbei ist  $\theta$  die charakteristische Rotationsdiffusionszeit. Für ein sphärisches Molekül in einem isotropen Medium existiert genau eine Rotationskorrelationszeit. Die Fluoreszenzdepolarisation kann aber auch aus mehreren Komponenten bestehen. Die einzelnen Komponenten setzen sich dann gemäß Gleichung (2-26) und (2-27) additiv zusammen mit dem jeweiligen prozentualen Beitrag  $g$  beziehungsweise  $r_{0,i}$  und ihrer Rotationskorrelationszeit  $\theta$ . Die Fluoreszenzdepolarisation kann sich aus mehreren Komponenten aufgrund eines sphärischen Fluorophors in unterschiedlichen Mikroumgebungen zusammensetzen oder aufgrund der Asymmetrie des Moleküls, welche unterschiedliche schnelle Diffusionsachsen zur Folge hat. Es ist allgemein anerkannt, dass theoretisch fünf verschiedene Rotationskorrelationszeiten existieren.[69,70] Zwei Paare sind davon an sich schon sehr ähnlich, so dass im Experiment nur drei verschiedene Rotationskorrelationszeiten aufgelöst werden können. Geht man von einem starren Molekül aus, so lässt sich dessen Form durch ein Ellipsoid mit drei unterschiedlich langen Achsen annähern. Daraus ergeben sich bei der Rotation drei Rotationsdiffusionskoeffizienten  $D_1$  bis  $D_3$ . Die meisten Moleküle lassen sich aber mit nur zwei unterschiedlich langen Achsen beschreiben; man spricht dann von Rotationsellipsoiden. Der ungleichen Achse wird der Rotationsdiffusionskoeffizient  $D_{\parallel}$  zugeordnet, den beiden gleichen Achsen der Koeffizient  $D_{\perp}$ . Ist die ungleiche Achse länger als die beiden gleichen Achsen, spricht man von einem prolaten Ellipsoid, im anderen Fall von einem oblaten Ellipsoid. Neben den unterschiedlichen Geometrien ist noch entscheidend, wie der Absorptions- und Emissionsübergangsdipol im Molekül liegt. Eine gute Übersicht der verschiedenen Fälle ist bei Lakowicz zu finden[67] oder generelle, theoretische Beschreibungen bei Chuang und Eisinger oder Tao.[70,71] Für das in der dieser Arbeit verwendete GFP wird entsprechend der Röntgenstruktur ein prolater Ellipsoid mit beiden Übergangsdipolmomenten senkrecht zur langen Achse vermutet.[72] Der beobachtete Anisotropiezerfall setzt sich dann wie folgt zusammen:

$$r(t) = 0.3 \cdot e^{-(4D_{\parallel} + 2D_{\perp})t} + 0.1 \cdot e^{-6D_{\perp}t} = 0.3 \cdot e^{-\frac{t}{\theta_1}} + 0.1 \cdot e^{-\frac{t}{\theta_2}} \quad (2-28)$$



Im Falle eines sphärischen Moleküls vereinfacht sich der Anisotropiezerfall zu einer Komponente, so dass sich der Rotationsdiffusionskoeffizient zu  $D = \gamma_{6\theta}$  errechnet.\*

Ein wichtiger zu behandelnder Punkt ist die segmentweise Bewegung der fluorophoren Gruppe innerhalb des Moleküls. Dies ist zum Beispiel bei der Proteinautofluoreszenz[73] oder auch fluoreszenzmarkierten Dextranen[74] zu beobachten. Bei einem annähernd sphärischen Molekül ergibt sich dadurch ein biexponentieller Zusammenhang bei der Fluoreszenzdepolarisation.

$$r(t) = r_0 \left( g_{\text{lokal}} \cdot e^{-\frac{t}{\theta_{\text{lokal}}}} + (1 - g_{\text{lokal}}) \right) e^{-\frac{t}{\theta_{\text{global}}}} \quad (2-29)$$

Dadurch erhält man im Experiment beim Anpassen einer biexponentiellen Funktion an die Messdaten zwei Rotationskorrelationszeiten; die lange ist dabei identisch mit der globalen Rotation des gesamten Moleküls,  $\theta_{\text{lang}} = \theta_{\text{global}}$ , die kurze ist dagegen die inverse Summe beider Rotationskorrelationszeiten. Somit errechnet sich die tatsächliche lokale Rotationskorrelationszeit der fluorophoren Gruppe nach

$$\frac{1}{\theta_{\text{lokal}}} = \frac{1}{\theta_{\text{kurz}}} - \frac{1}{\theta_{\text{lang}}} \quad (2-30)$$

Die zeitaufgelöste Messung der Fluoreszenzanisotropie liefert somit Informationen über die Rotationsdiffusion der Moleküle. Deren Ausmaß ist wiederum durch die molekulare Umgebung der Moleküle bestimmt. Dies ist durch das Debye-Stokes-Einstein Modell beschrieben. Neben dem Volumen des Moleküls als inhärente Eigenschaft korreliert auch die Temperatur  $T$  und die Viskosität  $\eta$  mit der Rotationskorrelationszeit. Der rechte Teil in Gleichung (2-31) ist eine andere Schreibweise des Zusammenhangs für Proteine. Dabei ist  $M$  das Molekulargewicht des Proteins,  $\bar{V}$  das spezifische Volumen in der Einheit  $\text{m}^3 \cdot \text{kg}^{-1}$  und  $h$  ist die Hydratisierung des Proteins, die je nach Protein sehr unterschiedlich ausfallen kann. Für nicht-sphärische Moleküle ist der Zusammenhang komplizierter und soll in dieser Arbeit nicht behandelt werden.

$$\theta = \frac{\eta V}{kT} = \frac{\eta M}{RT} (\bar{V} + h) \quad (2-31)$$

---

\* Im Ergebnisteil wird teilweise zwischen Rotations- und Translationsdiffusionskoeffizienten durch den Index „rot“ und „trans“ unterschieden. Da hier im Theorieteil keine Verwechslungsgefahr besteht, wird der Übersicht halber der Index komplett weggelassen.

### *Zeitaufgelöste Fluoreszenzanisotropie-Mikroskopie*

Im Gegensatz zu nicht zeitaufgelösten Messmethoden, bei denen nur eine mittlere beziehungsweise stationäre Anisotropie zugänglich ist (siehe hierzu auch Kapitel 4.1.5), erlaubt die zeitaufgelöste Messung des Anisotropiezerfalls den Zugang zu allen Größen aus Gleichung (2-26) beziehungsweise (2-27). Der horizontale und vertikale Detektionskanal ( $I_{\parallel}$  und  $I_{\perp}$ ) setzen sich aus dem Produkt von Fluoreszenzzerfall und Anisotropiezerfall zusammen.[75,76]

$$\begin{aligned} I_{\parallel} &= \frac{1}{3} [1 + 2r(t)] F(t) \\ I_{\perp} &= \frac{1}{3} [1 - r(t)] F(t) \end{aligned} \quad (2-32)$$

Setzt man die Ausdrücke in Gleichung (2-21) ein, so ergibt sich Identität; der Fluoreszenzzerfall kürzt sich heraus.

$$r(t) = \frac{I_{\parallel}(t) - I_{\perp}(t)}{I_{\parallel}(t) + 2I_{\perp}(t)} = \frac{r(t) \cdot F(t)}{F(t)} \quad (2-33)$$

Weiterhin ist ersichtlich, dass der Nenner aus Gleichung (2-21) die Gesamtfluoreszenz ergibt, in der keine Abhängigkeit vom Anisotropiezerfall mehr vorhanden ist. An dieser Stelle sei noch darauf hingewiesen, dass mit einem wie in dieser Arbeit konfokalen Aufbau bei nicht polarisation aufgelöster Detektion nicht die totale Intensität  $I_{\parallel}(t) + 2I_{\perp}(t)$  gemessen wird, sondern nur  $I_{\parallel}(t) + I_{\perp}(t) = \frac{2}{3}F(t) + \frac{1}{3}r(t)F(t)$ . Daher muss für präzise Fluoreszenzlebensdauer-Messungen entweder sichergestellt werden, dass der Anisotropiebeitrag entweder klein ist oder schnell abfällt, oder ein Polarisationsfilter im magischen Winkel zur Anregungspolarisation in den Detektionspfad eingebracht wird, da dann nach Gleichung (2-25)  $r_0 = 0$  wird und somit  $r(t) = 0$ . Durch den in Gleichung (2-32) bekannten Zusammenhang lässt sich die Anisotropie auch direkt aus den beiden Detektionskanälen bestimmen. Dies funktioniert aber nur bei monoexponentiellem Fluoreszenz- und Anisotropiezerfall sowie nicht zu stark unterschiedlichen Zeitkonstanten  $\tau$  und  $\theta$  mit hoher Genauigkeit und konnte in dieser Arbeit nicht angewendet werden.

Ein wichtiger Aspekt bei zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen ist die Instrumentantwortfunktion (englisch: *instrument response function*, IRF). Sie ist die Antwort des Detektionssystems auf einen  $\delta$ -Puls und ist damit für eine Pulsverbreiterung des gemessenen Signals verantwortlich. Die Laserpulse mit Pulsbreiten von  $<200$  fs sind schmal im Vergleich zu IRF und können daher in erster Näherung als  $\delta$ -Puls betrachtet werden. Mathematisch

betrachtet ist das beobachtete Intensitätssignal  $I(t)$  die Faltung der Fluoreszenzabklingkurve  $F(t)$  mit der IRF.

$$I(t) = IRF \otimes F(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} IRF(\xi) \cdot F(t - \xi) d\xi \quad (2-34)$$

Die IRF wirkt sich demnach auch bei der Berechnung der zeitaufgelösten Anisotropie beziehungsweise der zeitaufgelösten Fluoreszenz aus.

$$r(t) = \frac{I_{\parallel}(t) \otimes IRF - I_{\perp}(t) \otimes IRF}{I_{\parallel}(t) \otimes IRF + 2I_{\perp}(t) \otimes IRF} \quad (2-35)$$

Mathematisch ist die Entfaltung des Signals bei bekannter IRF durch Fouriertransformation möglich. Da jedes gemessene Signal jedoch hochfrequentes Rauschen enthält, ergeben sich im Fourier- beziehungsweise Frequenzraum Artefakte, die diese Prozedur stark störanfällig machen. Praktisch durchführbar ist die Einberechnung der IRF bei der Funktionsanpassung an die Messdaten; allerdings nur für die primären Intensitätsdaten aus Gleichung (2-32) und nicht aus dem komplexen Zusammenhang in Gleichung (2-35). [55,56] Hier ergeben sich aber die bereits angesprochen Limitierungen. Daher wird in dieser Arbeit die IRF nicht berücksichtigt und nur sogenannte *tail-fits* durchgeführt. Durch Berechnung von synthetisch gefalteten Zerfallskurven kann gezeigt werden, dass der Einfluss der IRF vor allem bei schnellen Anisotropiezerfällen gegeben ist und dort zu kleineren gemessenen initialen Anisotropien sowie längeren Rotationskorrelationszeiten führt. Bei einer Halbwertsbreite der IRF von typisch 100 ps für die in dieser Arbeit verwendeten Detektoren in dem verwendeten Wellenlängenbereich ist jedoch bereits bei Zerfallszeiten von >500 ps der Fehler für die initiale Anisotropie  $\leq 10\%$  und für die Rotationskorrelationszeit vernachlässigbar klein.

## 2.5 Photobleichen und FRAP

FRAP ist das Akronym für *fluorescence recovery after photobleaching*, in manchen Arbeiten wird synonym die Abkürzung FPR verwendet. Sie bezeichnet eine Methode zur Messung der translatorischen Mobilität von Molekülen auf einer  $\mu\text{m}$ -Skala. [77] Dazu werden fluoreszierende Moleküle in einem bestimmten Bereich innerhalb einer kurzen Phase durch Bestrahlung mit hoher Lichtintensität zu einem großen Teil gebleicht. Anschließend wird mit niedriger Intensität beobachtet, wie die durch das Bleichen reduzierte Fluoreszenz durch Eindiffundieren von ungebleichten Molekülen aus der Umgebung wiederhergestellt wird. Dieser Zusammenhang wird durch das zweite Ficksche Diffusionsgesetz beschrieben.

$$\frac{\partial}{\partial t} C(x, y, z, t) = D \nabla^2 C(x, y, z, t) \quad (2-36)$$

Das Photobleichen der Moleküle kann über verschiedene Wege ablaufen und dabei unterschiedliche Kinetik besitzen. Hierzu sei noch einmal das Jabłoński-Diagramm aus Abbildung 1 betrachtet. Ein wichtiger Pfad ist die Reaktion von Molekülen im Triplettzustand mit molekularem Triplett-Sauerstoff, wodurch eine irreversible Photooxidation stattfindet.[78] Dieser Prozess läuft schnell und effizient ab, jedoch sind auch Reaktionen mit der umgebenden Matrix oder Verunreinigungen möglich. Der Einfluss von molekularem Sauerstoff auf die Photobleichrate kann durch Vergleich mit entgasten Lösungen ermittelt werden. Ein weiterer Pfad ist die konsekutive Anregung aus dem ersten elektronisch angeregten Zustand in einen hochangeregten Zustand. Dabei kann die Anregung aus Singulettzuständen, Triplettzuständen oder auch dunklen Zuständen wie einer radikalischen Form des Fluorophors erfolgen.[78,79] Aus den reaktiven, hochangeregten Zuständen können leicht Photoreaktionen mit anderen Molekülen oder sich selbst stattfinden. Das in dieser Arbeit verwendete NBD-F (Kapitel 3.4.1) reagiert zum Beispiel von der Isoindol-Form in eine Lactam-Form;[80] NDA reagiert unter Ringöffnung des aromatischen Systems, beides unter Verlust der Fluoreszenz (siehe Kapitel 3.4.1).[81] Der zweite Prozess findet verstärkt bei hohen Anregungsintensitäten statt und spielt daher gerade bei Zweiphotonenanregung durch gepulste Laser eine wichtige Rolle.[82] Patterson und Piston konnten zeigen, dass die Photobleichrate für unterschiedliche Moleküle bei Zweiphotonenanregung proportional zur dritten Potenz oder höher ist und damit die These unterstützen.[83] Daher folgt das Photobleichen nur in wenigen Fällen einer einfachen Kinetik, die sich mit einem monoexponentiellem Abfall beschreiben ließe.

Beim Photobleichen zeigt sich die Zweiphotonenanregung vorteilhaft. Bei der Einphotonenanregung werden Moleküle auch außerhalb der Fokalebene angeregt und können damit gebleicht werden (siehe Abbildung 3). Damit ergibt sich kein klar begrenztes, definiertes Bleichvolumen, sondern ein nach außen schwächer werdender Doppelkegel entsprechend dem Intensitätsverlauf des Lichts durch eine Sammellinse. Durch Verwendung eines Objektivs mit kleiner numerischer Apertur lässt sich näherungsweise eine Zylindergeometrie annehmen. Für dünne Systeme wie zum Beispiel der Untersuchung der Diffusion in einer Doppellipidschicht (oder auch Zellmembran) tritt nur 2D-Diffusion auf und die Einphotonenbleichung ist hierfür gut geeignet. Für eine in dieser Arbeit untersuchte Hydrogelscheibe liegt hingegen ein dreidimensionaler Körper vor, so dass Multiphotonen-FRAP ohne Einschränkungen die Beobachtung von 3D-Diffusion erlaubt.

Die Lösung der Differentialgleichung (2-36) erfolgt in Abhängigkeit von den Randbeziehungsweise Startbedingungen. Daher ist der erste Faktor, der in der Aufstellung einer Modellgleichung eingehen muss, das gebleichte Volumen. Die einfachste Ansatz ist das

Bleichen mit einem stationären Laserstrahl. Das gebleichte Volumen bildet die dreidimensionale PSF nach und lässt sich in den meisten Fällen durch ein 3D-Gaußprofil beschreiben (Kapitel 2.3). Die Lösung der Differentialgleichung ist für diesen Fall bei Axelrod *et al.* sowie Brown *et al.* beschrieben.[77,84] Die Methode des stationären Laserstrahls hat den Nachteil, dass das Bleichvolumen sehr klein und das erhaltene Fluoreszenzsignal relativ klein ist. Für ein ausreichend gutes Signal-Rausch-Verhältnis muss die Messung vielfach wiederholt werden. Günstiger ist daher das Bleichen eines größeren Volumens, so dass die Intensität aus dem gesamten Bleichbereich als Datenpunkt verwendet werden kann. Außerdem skaliert die Fluoreszenzerholungszeit mit dem Radius des gebleichten Kreises, so dass dieser an den Diffusionskoeffizienten angepasst werden kann, um optimale Ergebnisse zu erhalten. Ist der Durchmesser des gebleichten Volumens in lateraler Dimension deutlich größer als die laterale Auflösung, so kann diese vernachlässigt werden und wird als  $\delta$ -Funktion angenommen. Somit ergeben sich als Startbedingungen für das Konzentrationsprofil  $C_b(r,z)$  für ein Kreisprofil nach der Notation von Mazza *et al.* folgende Gleichung, wobei hier der spezielle Fall einer Zweiphotonenbleichung und Zweiphotonenanregung für den FRAP-Prozess wiedergegeben wird.[85]

$$C_b(r,z) = \begin{cases} C_0 \cdot \exp\left[K_0 \cdot e^{-\frac{z^2}{\omega_{z,b}^2}}\right] & \text{für } r \leq w \\ C_0 & \text{für } r > w \end{cases} \quad (2-37)$$

Dabei ist  $C_0$  die homogene initiale Fluorophorkonzentration,  $K_0$  der Bleichparameter, der im Wesentlichen von der Intensität, dem Zweiphotonenabsorptionsquerschnitt und der Bleich-effizienz abhängt,  $w$  der Radius des Kreisprofils und  $\omega_{z,b}$  ist die effektive Bleichauflösung entlang der optischen Achse. Diese kann nicht mit der optischen Auflösung  $\omega_z$  während des Messens gleichgesetzt werden, da durch die hohe Bleichintensität Anregungssättigung stattfinden kann und die PSF dadurch messbar vergrößert wird.[86] Außerdem wird eine Bleichkinetik erster Ordnung angenommen, eine kurze Photobleichzeit, so dass während des Bleichens keine nennenswerte Diffusion stattfindet, und natürlich die Abwesenheit von Konvektion. Das Resultat der Lösung der Differentialgleichung (2-36) in Zylinderkoordinaten ist die Beschreibung des orts- und zeitabhängigen Konzentrationsprofils  $C(r,z,t)$ . Die Gleichung ist kompliziert und soll hier nicht genauer diskutiert werden, stattdessen wird an dieser Stelle auf die Herleitung von Braeckmans *et al.* verwiesen.[87] Zur Berechnung des orts- und zeitabhängigen Fluoreszenzprofils  $F(r,z,t)$  wird die Konzentrationsverteilung mit der PSF des Mikroskops gefaltet.

$$F(r, z, t) = \frac{\sigma^{(2)}}{2} E \cdot C(r, z, t) \otimes PSF \quad (2-38)$$

Dabei soll  $E$  die Gesamteffizienz des Detektionssystems darstellen. Die daraus erhaltene Gleichung ist wiederum sehr komplex. Vereinfachungen nach Soumpasis führen zu Gleichung (2-39).[88]

$$\frac{F_{\text{tot}}(t)}{F_{\text{tot},0}} = 1 + \sum_{i=1}^{\infty} \frac{(-K_0)^i}{i!} \frac{\frac{\omega_{z,b}}{\sqrt{2}}}{\sqrt{8iDt + \frac{\omega_{z,b}^2}{2} + i \frac{\omega_z^2}{2}}} \cdot \left[ 1 - e^{-\frac{w^2}{2Dt}} \left( I_0\left(\frac{w^2}{2Dt}\right) + I_1\left(\frac{w^2}{2Dt}\right) \right) \right] \quad (2-39)$$

Die Größe  $F_{\text{tot}}(t)$  ist der Verlauf der Fluoreszenzintensität im gebleichten Volumen und  $F_{\text{tot},0}$  ist die Fluoreszenzintensität vorm Bleichen. Die Größen  $I_0$  und  $I_1$  stehen für die Besselfunktionen erster Art und nullter beziehungsweise erster Ordnung. Die Größe  $D$  ist der zu bestimmende Translationsdiffusionskoeffizient, der durch Funktionsanpassung erhalten werden kann. Die axiale Bleich- und Messauflösung sollten als konstante Größen in die Funktionsanpassung durch separate Bestimmung eingehen, um die Anzahl der Parameter zu minimieren. Es hat sich gezeigt, dass die Berücksichtigung der ersten fünf Terme der unendlichen Serie bereits nur noch sehr kleine systematische Abweichungen erzeugt. Für einige Spezialfälle kann Gleichung (2-39) weiter vereinfacht werden. Desweiteren kann es aufschlussreich sein, neben dem Diffusionskoeffizienten auch den mobilen Anteil  $k$  der Moleküle zu kennen. Dazu muss die Modellgleichung (2-39) entsprechend erweitert werden.

$$F_{\text{tot}}(t) = F(0) + k[F(t) - F(0)] \quad (2-40)$$

Hier ist  $F(0)$  die Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt Null nach dem Photobleichen und  $F(t)$  die rechte Seite der Gleichung (2-39). Ein mobiler Anteil  $k \gg 1$  deutet auf Konvektion hin, ein Wert  $k < 1$  hingegen auf zwei oder mehr Populationen von Molekülen mit unterschiedlichen Diffusionskoeffizienten wie sie zum Beispiel durch Adsorption mit der umgebenden Matrix entstehen können.

Der durch Funktionsanpassung an das gemessene Fluoreszenz-Zeit-Profil erhaltene Translationsdiffusionskoeffizient kann durch die Stokes-Einstein Gleichung Rückschlüsse auf die Viskosität  $\eta$  oder den hydrodynamischen Radius  $r_h$  liefern.

$$D = \frac{kT}{6\pi \cdot \eta \cdot r_h} \quad (2-41)$$

## Kapitel 3 MATERIALIEN UND METHODEN

### 3.1 Messprinzipien

Um Fluoreszenz orts- und zeitaufgelöst zu detektieren, gibt es in der Zeitdomäne zwei unabhängige Ansätze. Der erste Ansatz geht von einem Mikroskopaufbau mit CCD-Kamera aus, welcher klassisch zur Erstellung von Durchlicht- oder Fluoreszenzbildern in Weitfeldausleuchtung angewendet wird. Wird als Lichtquelle ein gepulster Titan-Saphir Laser zur Zweiphotonenanregung genutzt und der fokussierte Laserstrahl durch Scanspiegel über die Probe gefahren, so resultiert das in zweidimensionalen Schnittbildern der Probe; eine Konsequenz der intrinsischen 3D-Auflösung der Zweiphotonenmikroskopie (siehe Kapitel 2.3). Durch axiales Verschieben des Laserfokus relativ zur Probe lässt sich ein dreidimensionales Abrastern der Probe erreichen. Die Zeitauflösung wird durch Einfügen eines Zeitfensters (*time gate*) im Detektionsweg zwischen Probe und Kamera erreicht, so dass nur Photonen in einen bestimmten Zeitraum relativ zum Puls detektiert werden. Dieses Zeitfenster kann in kleinen Schritten verschoben werden, so dass eine ortsaufgelöste Aufnahme der Fluoreszenzabklingkurve aufgenommen werden kann.

Der zweite Ansatz arbeitet mit einem stehenden Laserfokus, wobei die Fluoreszenz punktförmig detektiert wird. Die Probe auf dem Mikroskoptisch wird in alle drei Raumrichtungen verfahren. Gewöhnlich werden einzelne 2D-Bilder in lateraler Dimension aufgenommen und dann gegebenenfalls durch axiales Verschieben der Probe 3D-Bilder generiert. Die Detektionseinheit, die entweder aus einem Photomultiplier (PMT) oder aus dem Halbleiteranalogon (APD) besteht, kann den Auftreffzeitpunkt einzelner emittierten Photonen aus dem jeweiligen Bereich der Probe (Pixel) auf den Detektor genau festhalten. Durch das Zählen vieler Photonen pro Pixel und Einordnen in Zeitkanäle entsteht eine Fluoreszenzabklingkurve.

In dieser Arbeit kamen beide Methoden zum Einsatz. Während in der Arbeitsgruppe Prof. Gericke am Anfang ausschließlich mit dem Kameraaufbau gearbeitet wurde, wurde parallel ab Mitte 2008 ein zweites Mikroskop mit Einzelphotonenzählung aufgebaut. Ab Ende 2008 wurden alle Messungen am neuen Mikroskop durchgeführt. Da die Anregung der Fluorophore in beiden Fällen identisch ist, sind Messungen an den zwei Systemen aus physikalischer Sicht absolut vergleichbar. Nichtsdestotrotz ergeben sich aus den zwei Messprinzipien Vor- und Nachteile, die nach einer ausführlichen Darstellung beider Methoden kurz erläutert werden.

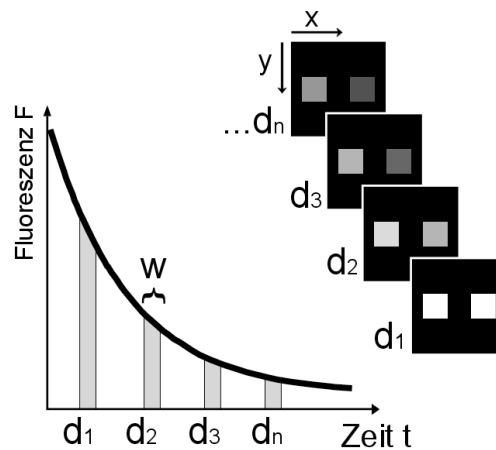
### 3.1.1 Time-Gated Fluorescence Imaging

Beim Zweiphotonen-Laserraster-Mikroskop wird der Laserstrahl über eine vom Benutzer gewählte Fläche der Probe gefahren. Aus diesem Bereich kommt die Fluoreszenz, welche dann auf einen Kamerachip abgebildet wird. Die makroskopische Zeitauflösung ergibt sich über die Belichtungszeit für ein Bild, beziehungsweise die maximale Bildwiederholrate. Die verwendete Kamera besitzt eine Wiederholrate von 50 Hz und somit eine minimale Belichtungszeit von 20 ms. Um den Fluoreszenzzerfall zeitlich aufzulösen, wird eine Lichtverstärkereinheit zwischengeschaltet. Dieser hat zum einen die Aufgabe, die lichtschwache Fluoreszenz zu verstärken. Zwischen zwei Metallplatten befinden sich eine Vielzahl von Mikrokanälen (*micro channel plate*, MCP), zwischen denen eine Spannung von mehreren 100 V anliegt. Ein auftreffendes Photon schlägt ein Elektron heraus, welche eine Vielzahl von Sekundärelektronen erzeugt. Diese treffen am Ende der Beschleunigungsstrecke auf einen Phosphorschirm, der wiederum von der Kamera detektierbare Photonen erzeugt. Durch schnelles An- und Ausschalten der Signalverstärkungsspannung können Zeitfenster  $w$  bis zu 200 ps realisiert werden, welche mit den Laserpulsen synchronisiert sind. Durch Verschieben dieses Zeitfensters relativ zum Laserpuls (*delay line*,  $d$ ) kann die Fluoreszenzabklingkurve schrittweise abgerastert werden. Die Integration aus einem Zeitfenster über eine gewählte Belichtungsdauer des CCD-Chips ergibt dann jeweils ein Bild in der Zeitdomäne. Dieser Sachverhalt stellt sich mathematisch wie folgt dar:

$$I_{x,y}(d) = C \int_d^{d+w} F_{x,y}(t) dt . \quad (3-1)$$

Aus einer kontinuierlichen Fluoreszenzabklingkurve  $F(t)$  ergeben sich somit diskrete Intensitätswerte  $I(d)$  für jeden Pixel. Eine andere Darstellung ist die Matrixform; es ergibt sich eine dreidimensionale Matrix mit den Matrixelementen  $I_{x,y,t}$ . Durch Anwenden einer geeigneten Fitfunktion, die in den allermeisten Fällen eine Exponentialfunktion ist, lassen sich aus der Zeitinformation Parameter wie die Fluoreszenzlebensdauer, Fluoreszenzanisotropie oder zum Beispiel auch präexponentielle Vorfaktoren extrahieren; das heißt  $I_{x,y,t}$  wird im Fall der Lebensdauer reduziert zu  $\tau_{x,y}$ . Das Messprinzip ist schematisch in Abbildung 6 skizziert.

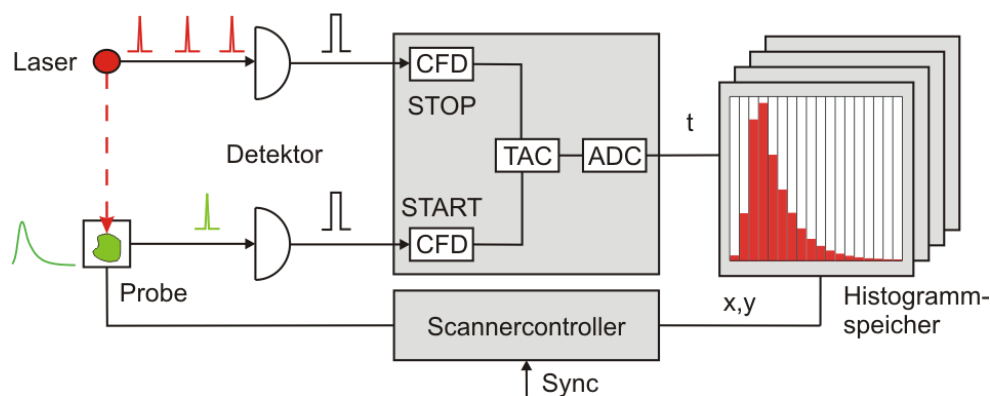




**Abbildung 6:** Prinzip des Time-Gatings zur Aufnahme einer Fluoreszenzabklingkurve.

### 3.1.2 Time-Correlated Single Photon Counting (TCSPC)

Bei der Einzelphotonenzählung, im folgenden TCSPC genannt, wird der Auftreffzeitpunkt eines Photons auf dem Detektor relativ zum Laserpuls festgehalten. Die Beschreibung des Messprinzips orientiert sich am Handbuch eines Herstellers für TCSPC-Module.[89] Zur Erläuterung ist Abbildung 7 hilfreich.



**Abbildung 7:** Aufbau der TCSPC Imaging Hardware zur Generierung von Fluoreszenzabklingkurven und Bildern. CFD – constant fraction discriminator, Aufbereitung der Rohsignale von Detektor und Diode zur genauen Zeitmessung; TAC – time to amplitude converter, Bestimmung der Photonenauftreffzeit relativ zum Laserpuls, ADC – AD-Konverter.

Durch das elektrische Signal einer Photodiode wird das TCSPC-Modul mit dem Laser synchronisiert. Das auf den Detektor auftreffende Photon ist das Startsignal (Trigger) für eine Art interne Stoppuhr. Es wird eine Spannungsrampe gefahren, die proportional zur verstrichenen Zeit ist (*time to amplitude converter*, TAC). Die Registrierung des nächsten Laserpulses erzeugt das Stoppsignal. Diese auf den ersten Blick weniger nachvollziehbare Variante (*reverse mode*) wird bei Systemen mit Laserwiederholraten im Megahertz-Bereich eingesetzt, da das Auftreffen eines Photons eine geringere Häufigkeit besitzt als die Laserpulse. Hierzu muss man wissen, dass Detektoren und auch die Signalverarbeitungselektronik nach Registrierung und Verstärkung eines Ereignisses eine gewisse Totzeit besitzen, in der sie

keine weiteren Ereignisse registrieren können. Die aktuelle Spannung wird in einem AD-Konverter einem Zeitpunkt zugeordnet. In einem Speicher wird dieses Ereignis in dem zugehörigen Zeitkanal abgelegt. Durch das Aufsummieren vieler einzelner Photonen ergibt sich ein Photonenhistogramm. Je länger die Integrationszeit, desto näher kommt das Histogramm gleich der Fluoreszenzabklingkurve eines Ensembles von Molekülen. Um mit einem TCSPC-System mit Punktdetektion Bilder zu generieren, bedarf es eines Scanners, der die Probe abrastert und dabei den Histogrammspeicher synchronisiert. Die Rohdaten bestehen aus einer Aneinanderreihung von Einzelzählereignissen, die mit der Registrierzeit relativ zum Puls, der absoluten Messzeit, gegebenenfalls der Detektornummer und der aktuellen Scannerposition versehen sind. Aus diesen Daten werden dann die Zerfallskurven und Bilder generiert.

### 3.1.3 Vergleich der Messprinzipien

Während die erzielten Daten beziehungsweise Ergebnisse aus den in Kapitel 3.1.1 und 3.1.2 vorgestellten Messprinzipien aus physikalischer Sicht zuerst einmal identisch sind, so gibt es in der Praxis doch einige Unterschiede, die hier Erwähnung finden soll.

Beim Kameraaufbau wird der Laserstrahl mithilfe eines Galvoscaners relativ zur Probe bewegt, bei der TCSPC-Methode wird hingegen die Probe samt Probenhalterung durch einen Piezoscanner verschoben. Aufgrund der höheren Trägheit und der Notwendigkeit zum Einschwingen des Piezoscaners vor der eigentlichen Messung ist die Aufnahmezeit für ein reines Intensitätsbild mit dem Kameraaufbau deutlich kürzer. Dies könnte durch Verwendung eines Galvoscaners und einem konfokalen Descanned-Aufbau umgangen werden. Bei der Untersuchung von Polymerfolien (Kapitel 4.1) spielt dieser Zeitnachteil keine Rolle, bei Verwendung der FRAP-Methode (Kapitel 4.2.2) wird das Beobachten schneller Diffusionsprozesse hingegen unmöglich.

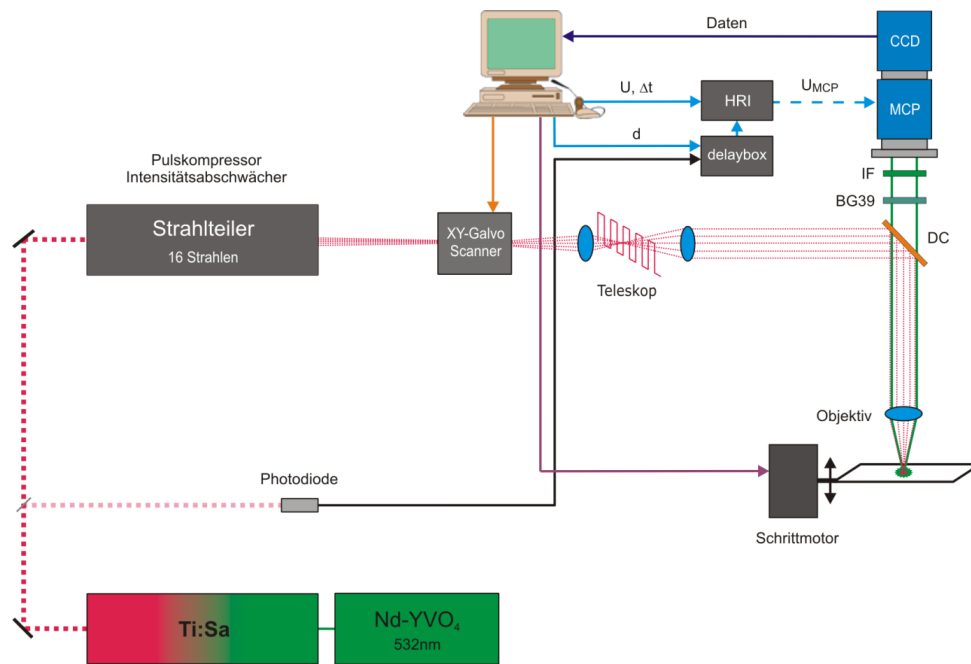
Unter Einbeziehung der Zeitauflösung auf molekularer Ebene, also beim Aufnehmen von Lebensdauer- und Anisotropiekurven und Bildern relativiert sich der Sachverhalt aber wieder. Für ein Lebensdauerbild mit dem Kameraaufbau müssen viele Einzelbilder mit einem zum Puls verschobenen Belichtungsfenster aufgenommen werden, beim TCSPC-Mikroskop wird das Photonenhistogramm je Pixel erzeugt. Die Delay-Unit des Kameraaufbaus beherrscht als minimale Gateverschiebung 25 ps mit einer Schwankungsbreite (Jitter) von 10 ps, das TCSPC-Modul hingegen bis zu 4 ps Zeitauflösung bei ähnlicher Unsicherheit. Dementsprechend müsste man für eine ähnliche gute Zeitauflösung wie für die TCSPC-Methode mit der Kamera 520 Bilder bei einem Messfenster von 13 ns aufnehmen, so dass sich bei vergleichbarer Zeitauflösung längere Aufnahmedauern ergeben würden.

Ein Nachteil des Kameraaufbaus ergibt sich auch durch die geringe räumliche Auflösung der MCP. Dies begründet sich in der Tatsache, dass benachbarte Mikrokanäle eine gewisse Wechselwirkung (*crosstalk*) miteinander besitzen. Hierdurch ergibt sich ein Verschmieren der Bildkonturen, welches auch durch Einbringen einer Nachvergrößerung in den Detektionsweg nicht vollständig kompensiert werden kann. Außerdem sorgen gestreute Photonen bei einem Kameraaufbau für eine Unschärfe bei der Ortsinformation. Durch die Punktdetektion der TCSPC-Methode erhält man hingegen immer die volle Auflösung des beugungslimitierten Laserfokus.

Ein wichtiger Unterschied zwischen den zwei Messprinzipien ergibt sich bei der Berücksichtigung von Photobleichen (siehe Kapitel 2.2 und 2.5). Dieser Prozess spielt vor allem dann eine wichtige Rolle, wenn die Fluorophore aufgrund ihrer Größe oder Mikroumgebung nur langsam diffundieren können oder sogar immobilisiert sind. Dies trifft sowohl für die Untersuchung von funktionalisierten Polymeren (Kapitel 4.1), als auch von Hydrogelen (Kapitel 4.2) zu. Da beim Kameraaufbau zur Aufnahme einer Fluoreszenzabklingkurve mehrere Bilder hintereinander aufgenommen werden, ist die aufgenommene Abklingkurve das Produkt von Fluoreszenz und Bleichkinetik. Bei der Einzelphotonenzählung ergeben sich durch Photobleichen im stehenden Fokus mit der Zeit zwar niedrigere Zählraten; dennoch wird die Fluoreszenzabklingkurve unverfälscht aufgenommen. Dadurch ergibt sich eine zuverlässigere Analyse zeitaufgelöster Fluoreszenzmessungen.

### **3.2 Experimenteller Aufbau für dreidimensionales Aminogruppen-Imaging**

Zur Aufnahme von fluoreszenzmarkierten Gruppen auf Polymeroberflächen wurde ein Zweiphotonen-Laserscanning-Mikroskop verwendet. Der Aufbau ist in Abbildung 8 schematisch dargestellt.

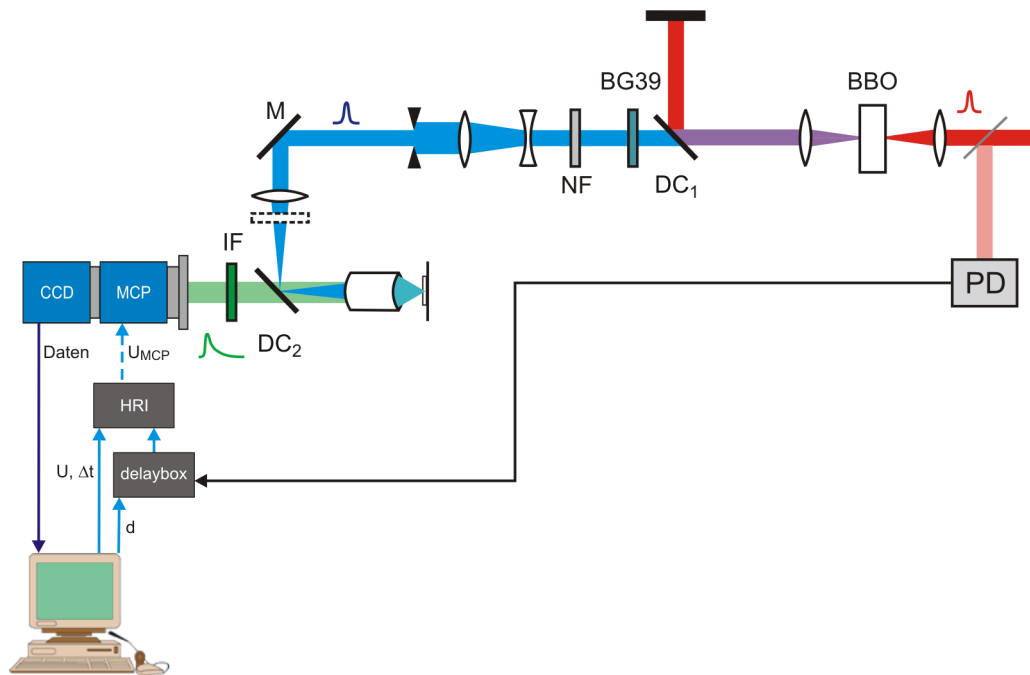


**Abbildung 8:** Aufbau des Zweiphotonen-Laserscanning-Mikroskops.

Als Anregungslicht dient ein Titan-Saphir Laser (Mira™ 900-B, Firma Coherent®), der durch einen Diodenlaser betriebenen Neodym-Yttriumorthovanadat-Laser (Verdi® V-10, ebenfalls Coherent®) mit Frequenzverdoppelung gepumpt wird. Der Titan-Saphir Laser erzeugt durch passive Modenkopplung ultrakurze Pulse mit einer Pulsbreite von circa 200 fs bei einer Wiederholrate von 76 MHz und einem durchstimmbaren Wellenlängenbereich von 740-850 nm. Die maximal erzielte Ausgangsleistung liegt bei 1.6 W. Der Laserstrahl wird in einer Strahlteilereinheit auf 16 Foki aufgespalten. Der Aufbau entspricht dem Prototyp eines TriMScope® der Firma LaVision BioTec. Das Kernstück der Einheit ist eine Glasplatte mit 50% Transmission und 50% Reflexion. Zur genauen Beschreibung sei auf die Arbeit von Nielsen *et al.* sowie Denicke verwiesen.[56,90] Das multifokale Arbeiten ermöglicht eine schnellere Datenaufnahme, da die auf die Probe eingehende Laserleistung durch Aufspaltung auf die Foki voll genutzt werden kann. Die 16 Foki sind in 8 Foki paralleler und senkrechter Polarisation aufgeteilt, um Interferenzen zwischen benachbarten Foki zu vermeiden und auch für Anisotropiemessungen genutzt werden kann (siehe Abschnitt 3.3). Durch eine Galvo-scanner der Marke GSI™ (VM-500 C) werden die Strahlen durch zwei Spiegel in x-beziehungsweise y-Richtung abgelenkt. Vor der Einspeisung ins Mikroskop werden die Strahlen aufgeweitet und parallelisiert, da die verwendeten Objektive auf unendlich-Optik ausgelegt sind. Ein dichroitischer Spiegel (DC) reflektiert das nah-infrarote Anregungslicht und transmittiert die erzeugte Fluoreszenz in einem Wellenlängenbereich von circa 350-600 nm. Soweit nicht anders vermerkt, wird als Objektiv ein Zeiss EC Plan-NEOFLUAR 40× NA 1.30 mit Ölimmersion verwendet. Die durch das Objektiv gesammelte Fluoreszenz

wird durch ein Schott BG39-FarbfILTER vom restlichen Anregungslicht abgetrennt. Eine weitere spektrale Aufreinigung erfolgt je nach Experiment durch einen Interferenzfilter (IF, Firma Semrock, BrightLine® FF01-530/40 oder FF01-460/80). Zur optimalen Abbildung auf die MCP sorgt ein Linsensystem (aus Gründen der Übersichtlichkeit in Abbildung 8 nicht dargestellt) bestehend aus einer 165 mm Tubuslinse, einer 2.5× Nachvergrößerung und einer Fokussierlinse. Um die maximale optische Auflösung nutzen zu können, darf maximal das Licht aus einer punktförmigen Quelle auf einen MCP-Pixel abgebildet werden; in der Praxis werden zwei bis drei Pixel in einer Dimension genutzt. Zur Verschiebung der Probe in axialer Richtung wird ein Software-gesteuerter Schrittmotor mit 0.1 µm Genauigkeit der Firma PI Physik Instrumente (Modell 4733) genutzt. Die Detektionseinheit (ICCD) besteht aus einer MCP (PicoStar HR, 260-800 V) und CCD (PicoStar Imager, 640×480 Pixel, 12 Bit) der Firma LaVision sowie einem High Rate Image Intensifier, der die MCP mit Spannung versorgt und steuert (*gating*) und einer Delay Einheit zur Verschiebung des Messfensters (beide Kentech Instruments). Der HRI erlaubt Gatebreiten von 200-1000 ps sowie einen DC-Modus. Die kleinste wählbare Schrittweite der Delay Einheit beträgt 25 ps.

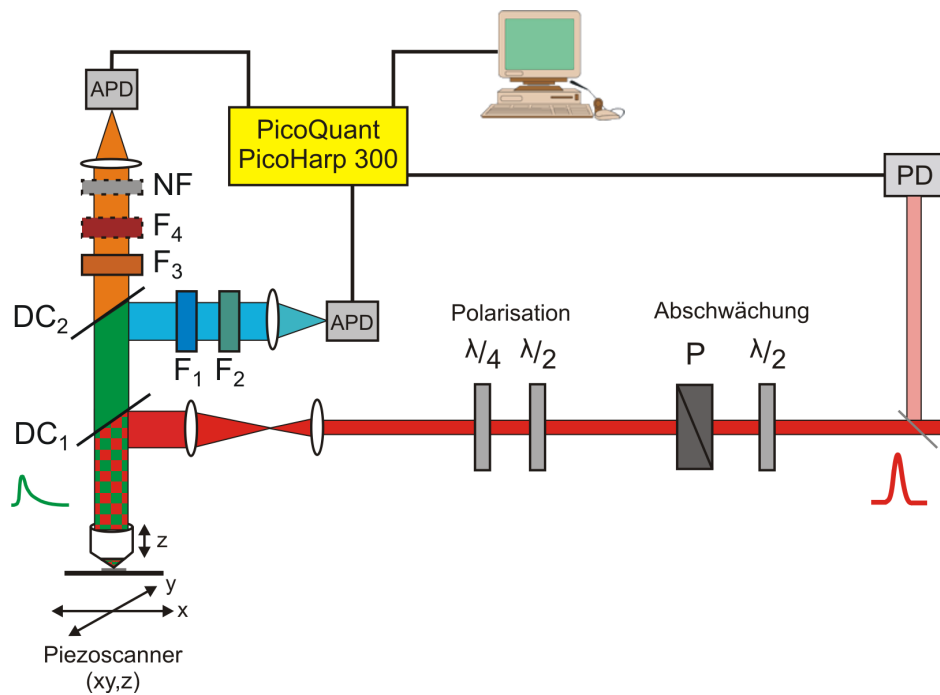
Die Verwendung eines gepulsten Infrarotlasers zur Zweiphotonenanregung eignet sich für viele zu untersuchende Substrate, da die meisten Stoffe eine geringe Absorption im Nahinfraroten aufweisen. Dies ist bei Polypropylen-Ruß Kompositen (PP/C) nicht der Fall. Durch den fokussierten Laserstrahl ergibt sich lokal eine starke thermische Belastung, die zur Zerstörung der plasmabehandelten Oberfläche führt. Zur Vermeidung dieses unerwünschten Phänomens kann der Aufbau so abgeändert werden, dass die Probe durch eine Einphotonen-Weitfeldanregung untersucht werden kann. Bei vergleichbarer Fluoreszenzintensität erfordert eine Einphotonenanregung einen viel geringeren Photonenfluss als eine Zweiphotonenanregung (siehe Kapitel 2.2 und 2.3). Durch das Defokussieren des Strahls erfolgt eine weitere Photonflussreduktion. Als Nachteil ist der Verlust der Tiefenauflösung durch die Weitfeldausleuchtung zu nennen, welcher aber aufgrund der Opazität der Probe keine nennenswerte Rolle spielt. Trotz dieser Modifikation kann weiterhin zeitaufgelöst mit der ICCD gemessen werden, da der Laserpuls aus dem Titan-Saphir frequenzverdoppelt wird (siehe Abbildung 9).



**Abbildung 9:** Einphotonen-Weitfeldaufbau zur Untersuchung stark absorbierender Substrate.

Zur Erzeugung der Frequenzverdoppelung wird der Laserstrahl auf einen  $\beta$ -Bariumborat-Kristall (BBO) fokussiert und anschließend wieder parallelisiert. Ein dichroitischer Spiegel ( $DC_1$ ) trennt das fundamentale Licht vom frequenzverdoppelten ab. Anschließend wird der Strahl spektral aufgereinigt (BG39) und aufgeweitet. Um eine möglichst homogene Ausleuchtung der Probe zu erhalten, wird ein mit 220er oder 1500er Korngröße polierter Diffusor in den Strahlengang eingebaut. Ein zweiter dichroitischer Spiegel ( $DC_2$ ) trennt Anregungs- und Fluoreszenzlicht voneinander. Der Detektionsweg ist mit dem oben beschriebenen identisch.

Die Unterscheidung primärer und sekundärer Amine wurde durch Doppellabeling (siehe Abschnitt 3.4) am TCSPC-Mikroskop realisiert.



**Abbildung 10:** Aufbau zur Aminunterscheidung mit dem TCSPC-Mikroskop.

Der oben genannte Titan-Saphir Laser wurde durch ein neueres Modell ersetzt (Mira™ 900-D, 76 MHz, <200 fs, 700-980 nm). Als Zusatzmodul ist ein Cavity Dumper der Firma APE nachgeschaltet. Neben der Möglichkeit zur Verringerung der Wiederholfrequenz bietet es eine Frequenzverdoppelungseinheit (SHG) mit automatischer Strahlkompensation. Diese Ausstattung wurde in dieser Arbeit nicht genutzt, ist aber für zukünftige Anwendungen von Interesse. Der Laserstrahl kann durch eine Kombination von Halbwellenplatte ( $\lambda/2$ ) und Polarisationswürfel (P) kontinuierlich abgeschwächt werden. Die nachfolgenden Wellenplatten dienen zur Manipulation der Polarisation (genauere Beschreibung in Kapitel 3.3). Alle Wellenplatten sind von der Firma B. Halle Nachf. gefertigt und sind achromatisch für einen Wellenlängenbereich von 600-1200 nm. Nach einer Strahlaufweitung wird das Laserlicht durch einen dichroitischen Spiegel (DC<sub>1</sub>, T 700 DCSPXR-UV, Firma Chroma) in das Mikroskop eingespeist. Als Objektiv wird das oben erwähnte 40× 1.30 NA Ölobjektiv verwendet. Als Scanner wird lateral ein Piezo der Firma PI Physik Instrumente (P-733.2CL) und axial als Objektivpiezo das Modell P-721.CLQ (PIFOC®) verwendet. Beide Scanner erlauben einen Verstellweg von je 100 µm bei einer Auflösung besser als 1 nm. Die Scanner werden über einen E-710 Piezo Controller (ebenfalls PI) gesteuert. Durch Verbindung des Piezo Controllers mit der zentralen Steuereinheit PicoHarp 300 (Firma PicoQuant) wird die Synchronisation erreicht. Die entstehende Fluoreszenz passiert den ersten Dichroiten. Der zweite Dichroit (DC<sub>2</sub>, DMLP567, Firma Thorlabs) trennt die Fluoreszenz der beiden Labelfarbstoffe. Die kurzwelligere Emission wird durch einen BG39 und den Interferenzfilter FF01-460/80 aufgereinigt, die langwellige Emission durch den Filter FF01-630/92 und

gegebenenfalls durch einen Notchfilter (NF02-405U, beide Firma Semrock, BrightLine®). Da die Fluoreszenzintensität für den langwelligeren Kanal im Experiment viel höher ist, wurde bei einigen Messungen ein 5% Neutralfilter (NF) zur Abschwächung eingesetzt. Beide Fluoreszenzkanäle werden auf eine Lawinenphotodiode (*avalanche photo diode*, APD) des Typs PD1CTC (MPD Micro Photon Devices) fokussiert. Die PicoHarp Einheit kann die Ankunftszeit eines Photons in bis zu 4 ps schmale Zeitkanäle einordnen und besitzt eine maximale Datenverarbeitungsrate von 5 MHz.

Wenn die Substrate mit nur einem Farbstoff markiert sind, wird der zweite dichroitische Spiegel (DC<sub>2</sub>) entfernt, sowie der zweite Detektor ausgeschaltet.

### 3.3 Experimenteller Aufbau für Anisotropiemessungen

Der einfachste Ansatz zum Aufnehmen einer Fluoreszenzanisotropie ist das Einführen eines Polarisationsfilters in den Detektionsweg. Dieser besteht aus linear ausgerichteten Polymeren, welche parallel einstrahlendes Licht absorbieren und senkrecht einfallendes Licht transmittieren. Durch zwei Messungen, eine mit Polarisationsfilter parallel zur Polarisation des Anregungslichts und eine senkrecht dazu, kann eine Anisotropiekurve aufgenommen werden. Jedoch müsste für beide Einzelmessungen die Detektionseffizienz identisch sein, was eine Isotropie der optischen Bauteile zur Voraussetzung hätte. Allein durch den dichroitischen Spiegel ist diese Voraussetzung nicht erfüllt; der Transmissionsgrad ist unterschiedlich für parallele und senkrechte Polarisation. Die Differenz der Detektionseffizienz muss mit einem Korrekturfaktor berücksichtigt werden. Dieser wird üblicherweise Gerätefaktor oder kurz G-Faktor genannt. Somit wird Gleichung (2-21) zu:

$$r = \frac{I_{\parallel} - G \cdot I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2G \cdot I_{\perp}} \quad (3-2)$$

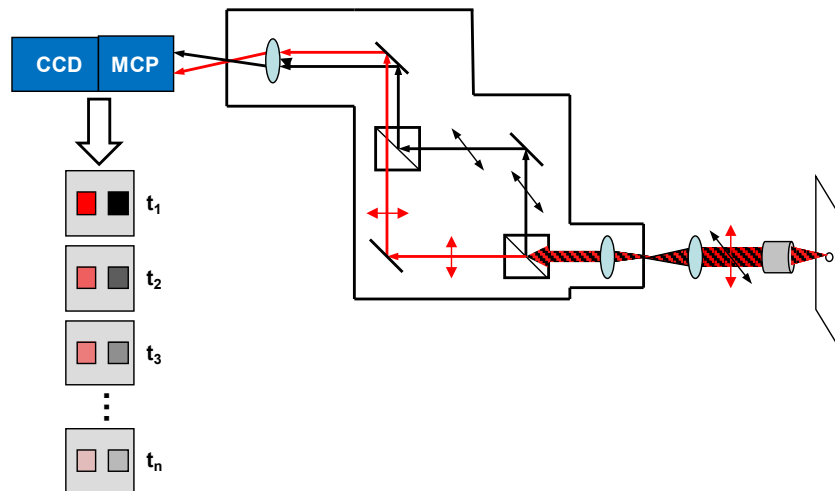
Für den ausschließlich verwendeten kollinearen Aufbau im Mikroskop, das heißt Anregungs- und Emissionslicht sind parallel zueinander, errechnet sich der G-Faktor durch Formel (3-3).[75]

$$G = \sqrt{\frac{I_{VV} \cdot I_{HV}}{I_{VH} \cdot I_{HH}}} \quad (3-3)$$

Der erste Buchstabe des Subskripts bezeichnet die Anregungspolarisation, *H* für horizontal, *V* für vertikal, relativ zu einer definierten Ebene, in diesem Fall der Labortisch. Der zweite Buchstabe bezeichnet die Emissionspolarisation. Zwei gleiche Buchstaben repräsentieren somit den parallelen Kanal, zwei unterschiedliche den senkrechten. Für eine



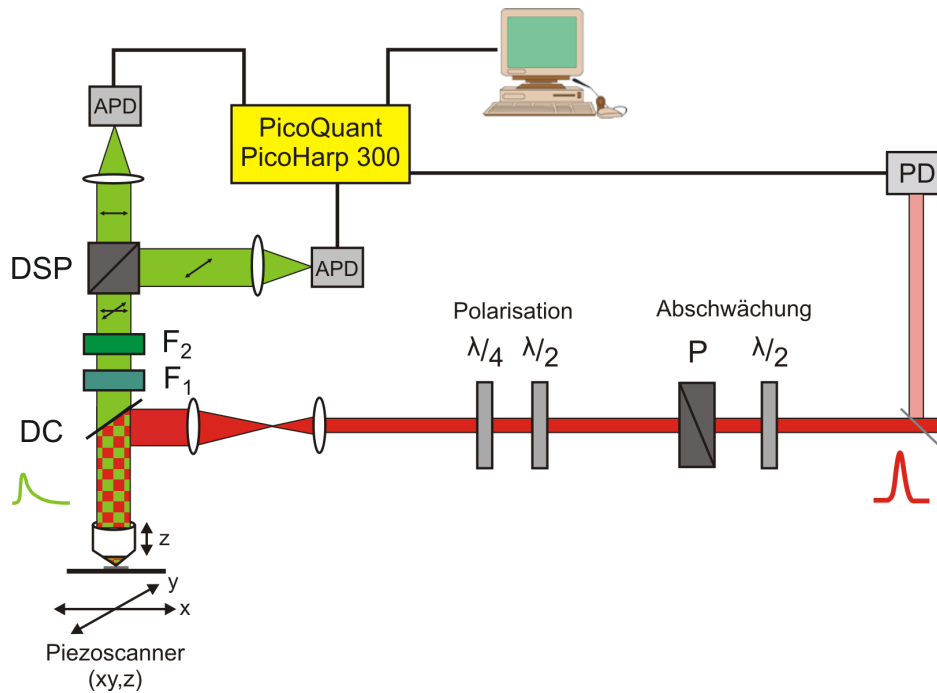
zuverlässige Anisotropiemessung müssen also vier Einzelmessungen vorgenommen werden. Zur Beschleunigung der Messungen wird für Anisotropiemessungen in den Detektionsweg (vergleiche Abbildung 8) ein W-View der Firma Hamamatsu zwischen Dichroiten und MCP eingesetzt. Der Aufbau des W-View ist in Abbildung 11 skizziert.



**Abbildung 11:** Anisotropiemessungen mit dem Kameraaufbau unter Verwendung des Hamamatsu W-View Optics A8509.

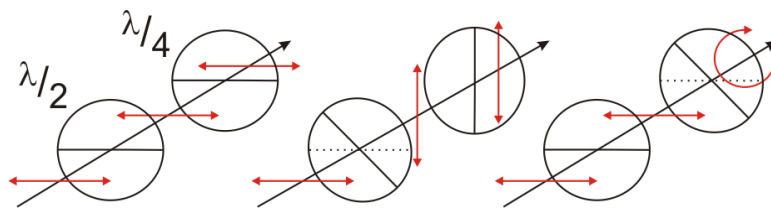
Das parallelisierte Emissionslicht wird zuerst verkleinert, da auf dieselbe Detektorfläche der MCP zwei Halbbilder abgebildet werden müssen. Der erste Polarisationswürfel spaltet die parallele und senkrechte Polarisation auf. Diese werden auf einem zweiten Polarisationswürfel wieder vereinigt, besitzen jedoch nun einen Versatz zueinander. Auf diese Weise können zwei Polarisierungen simultan aufgenommen werden und die Anzahl der Messungen reduziert sich von vier auf zwei.

Für das TCSPC-System ist die Realisierung polarisationsaufgelöster Messungen simpler, da der Detektionsaufbau auf einem modularen Mikrobanksystem beruht. Den Messaufbau zeigt Abbildung 12.



**Abbildung 12:** TCSPC-Aufbau für Anisotropiemessungen.

Der Aufbau entspricht bis auf den Detektionsweg dem in Kapitel 3.2 beschriebenen System. Die durch den Dichroiten (DC) transmittierte Fluoreszenz wird spektral durch einen Schott Farbfilter BG39 ( $F_1$ ) und einen Interferenzfilter Semrock BrightLine® FF01-530/40 ( $F_2$ ) aufgereinigt. Ein polarisierender Strahlteilerwürfel (Dünnschichtpolarisator, DSP) spaltet die Fluoreszenz in einen parallelen und senkrechten Kanal auf. Diese werden auf einen APD-Detektor fokussiert und vom PicoHarp-System verarbeitet. Durch Manipulation der Verzögerungsplatten kann horizontale, vertikale, zirkular rechts- und linksdrehende Anregungspolarisation erzeugt werden (siehe Abbildung 13).



**Abbildung 13:** Stellung der Wellenplatten zur Polarisationsmanipulation. Die eingezeichnete optische Achse besitzt den höheren Brechungsindex.

Sind die optischen Achsen beider Platten parallel zur linearen Polarisation des Laserlichts (links), so passiert der Strahl unverändert die Platten. Wird die  $\lambda/2$ -Platte um  $45^\circ$  gedreht (Mitte), so wird das linear polarisierte Licht um  $90^\circ$  gedreht; aus horizontalem Licht wird vertikales Licht. Bleibt hingegen die  $\lambda/2$ -Platte unverändert und die  $\lambda/4$ -Platte wird um  $45^\circ$  gedreht (rechts), so wird zirkular polarisiertes Licht erzeugt, welches je nach Drehrichtung der Wellenplatte links- oder rechtsdrehend ist. Dies macht bei den durchgeführten Experimenten

jedoch keinen Unterschied, so dass hier allgemein von zirkular polarisiertem Licht gesprochen wird.

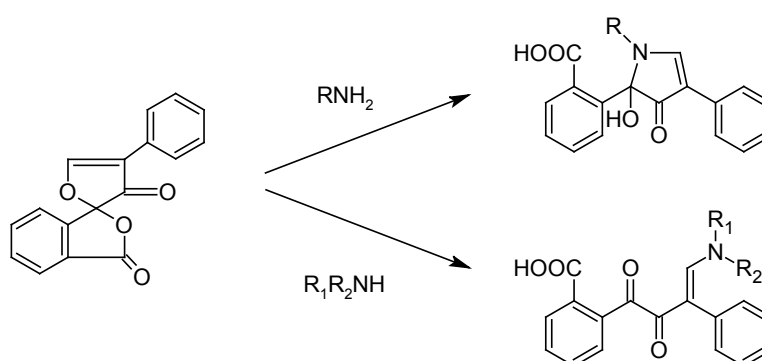
### 3.4 Farbstofflabeling plasma-aminierter Polymere

Die verwendeten Farbstoffe müssen hohen Anforderungen genügen. Sie sollen eine hohe Quantenausbeute, einen hohen Zweiphotonenanregungsquerschnitt und eine hohe Photostabilität besitzen. Ferner spielen auch Faktoren wie die Größe des Moleküls oder die Polarität eine Rolle, wenn es um das Labeln von Polymerfolien geht. Als großer Vorteil erweist es sich, wenn die benutzten Farbstoffe fluorogen sind. Das heißt, dass sie erst bei einem bestimmten Ereignis fluoreszieren, zum Beispiel wenn sie an eine bestimmte funktionelle Gruppe binden. Aufgrund der breiten Anwendung in der Bioanalytik gibt es einige kommerziell erhältliche Farbstoffe, die erst nach Reaktion mit einem Amin fluoreszieren. Allerdings ist zu beachten, dass die meisten Untersuchungen zu den eingesetzten Farbstoffen für Aminosäuren in wässriger Lösung erfolgt sind. Für den Einsatz als Fluoreszenzmarkierung für Aminogruppen auf Polymerfolien hingegen gibt es bisher nur wenige bis keine Erkenntnisse.

#### 3.4.1 Eigenschaften der verwendeten Farbstoffe

##### *Fluorescamin*

Fluorescamin (4-Phenylspiro-[furan-2(3*H*),1-phthalan]-3,3'-dion, Fluram®, Fluka) fluoresziert spezifisch nach Reaktion mit einem primären Amin. Auch mit einem sekundären Amin bildet sich ein stabiles Produkt, welches jedoch nicht fluoresziert.[91]



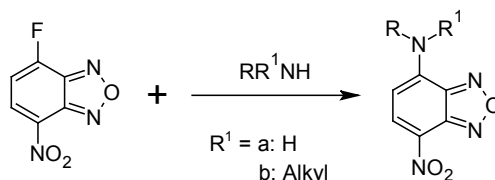
**Abbildung 14:** Reaktion von Fluorescamin mit primären und sekundären Aminen.

Die Reaktion verläuft bei Raumtemperatur in wenigen Sekunden. Fluorescamin ist hydrolyseempfindlich; das Hydrolyseprodukt fluoresziert nicht.[92] Das Maximum des Anregungsspektrums  $\lambda_{\text{ex}}$  liegt nach Herstellerangaben bei 390 nm, das Maximum des Emissionsspektrums  $\lambda_{\text{em}}$  liegt bei 475 nm bei pH 8.5 nach Derivatisierung mit L-Leucin. Aufgrund der niedrigen Symmetrie ist das Zweiphotonen-Absorptionsmaximum bei der doppelten Wellen-

länge zu erwarten. Es liegt nach Messungen von Shear *et al.* bei circa 1.1 GM für 760 nm.[93] Es sind bereits einige Studien publiziert worden, in denen Fluorescamin als Nachweis für primäre Aminogruppen auf Oberflächen verwendet wurde.[30,94] Erwähnenswert sei hier die Beobachtung, dass das Emissionsmaximum für hohe Aminogruppendichten eine Rotverschiebung erfährt.[95] Das Fluorescamin-Addukt besitzt für verschiedene Amine in Ethanol eine Quantenausbeute  $\Phi$  von 0.09 bis 0.34 und mit Butylamin derivatisiert eine Lebensdauer  $\tau$  von 1.7 ns in Wasser (pH 6.8) bis zu 11.7 ns in Acetonitril.[96]

#### NBD-F

NBD-F (4-Fluor-7-nitrobenzofurazan, Fluka oder Acros) gehört zu der Klasse der vielseitig verwendbaren Benzofurazane und reagiert spezifisch mit primären und sekundären Aminen zu einem Fluorophor.

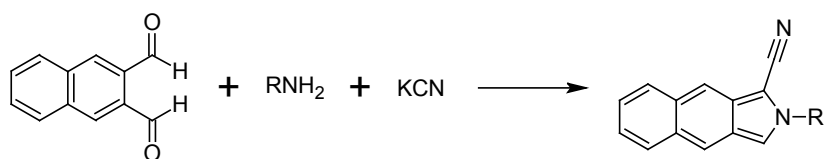


**Abbildung 15:** Reaktion von NBD-F mit einem primären oder sekundären Amin.

Die Fluorfunktion ist anfällig gegenüber Hydrolyse und reagiert zu dem fluoreszierenden Produkt 4-Hydroxy-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD-OH).[92] Die Reaktion mit Alkoholen und Thiolen liefert keine fluoreszierenden Produkte.[80] Der Benzofurazan-Aromat besitzt neben einer  $\pi$ - $\pi^*$ -Bande im nahen UV eine CT-Bande im blauen Wellenlängenbereich, wobei die Aminogruppe als Donor und die Nitrogruppe als Akzeptor fungiert.[97,98] Die photophysikalischen Eigenschaften sind daher sehr sensitiv gegenüber vielen Parametern. Neben Art und Polarität des Lösungsmittels (Solvatochromie) spielt auch die Art des derivatisierten Amins (primär/sekundär, Art der organischen Restes) eine große Rolle.[80,99] Auch wurde eine Viskositäts- und Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenzeigenschaften beobachtet. So spannen Quantenausbeute und Fluoreszenzlebensdauer mehr als eine Zehnerpotenz auf ( $\Phi$  von <0.01 bis 0.8,  $\tau$  von 0.4 ns bis 11 ns). Das Maximum des Anregungsspektrums  $\lambda_{ex}$  deckt einen Bereich von 420 bis 500 nm ab; das Maximum des Emissionsspektrums  $\lambda_{em}$  variiert zwischen 490 und 570 nm. Über Messungen von Zweiphotonen-Absorptionsquerschnitten ist nichts bekannt. So wurde die optimale Anregungswellenlänge aufgrund von Symmetriebetrachtungen (Kapitel 2.2) als das doppelte des Einphotonenmaximums angenommen.



Stabilität als bei der Reaktion mit einem Thiol zeigt und bei gleichem Amin eine in etwa 300-fach höhere Fluoreszenzintensität besitzt.[81,103]

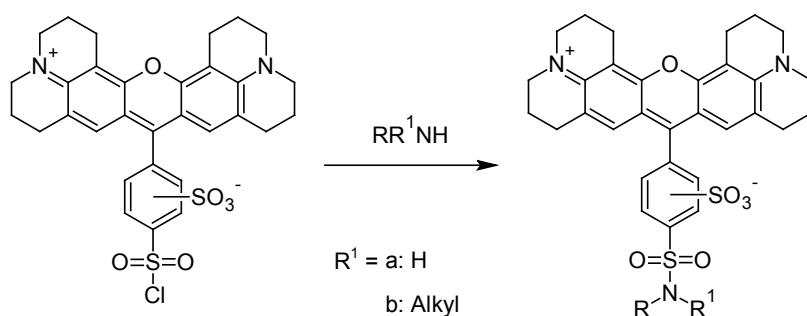


**Abbildung 17:** Reaktion von NDA mit einem primären Amin.

Nachteilig ist durch den Einsatz von Kaliumcyanid die Beschränkung auf Wasser und niedere Alkohole als Lösungsmittel. Alternativ verwendbare Isocyanide zeichnen sich hingegen durch nur mäßige Stabilität, hohen Dampfdruck und üblen Geruch bei ähnlich hoher Giftigkeit aus. Beim Einsatz von NDA muss auch die mögliche Selbstkondensation in Gegenwart von Cyaniden und Sauerstoff berücksichtigt werden.[104] Um diese Nebenreaktion zu minimieren, dürfen NDA und Cyanidlösung erst direkt vor dem Labeling zusammengegeben werden. Nach der Reaktion ist NDA ähnlich wie OPA anfällig für Zersetzungsreaktionen, die zum Beispiel zum nichtfluoreszierenden Lactam führen können.[81] Laut Hersteller ist das Absorptionsmaximum bei  $\lambda_{\text{ex}} = 420 \text{ nm}$ , das Emissionsmaximum bei  $\lambda_{\text{em}} = 480 \text{ nm}$  für pH 9.3 zu finden. Das Zweiphotonen-Absorptionsmaximum liegt aufgrund der Symmetrie des Moleküls erwartungsgemäß bei etwa der doppelten Wellenlänge des Einphotonenmaximums. Der Absorptionsquerschnitt für 840 nm beträgt circa 0.5 GM.[93] Für die Quantenausbeute wurden in wässrigem Acetonitril (40:60) bei pH 7 Werte bis zu 0.66 berichtet,[105] für unpolarere Lösungsmittel ergeben sich niedrigere Werte.[106]

### *Sulforhodamin 101*

Das Säurechlorid des Sulforhodamin 101 (SR101, Texas Red®, Sigma) ist im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Farbstoffen nicht fluorogen. Die reaktive Gruppe des Moleküls ist die Sulfonylchloridgruppe, die mit primären und sekundären Aminen zu einem Sulfonamid reagiert. Die Reaktion ist in Abbildung 18 dargestellt.



**Abbildung 18:** Reaktion von Sulforhodamin101 Säurechlorid mit einem primären oder sekundären Amin.

Die Sulfonylchloridgruppe reagiert recht unspezifisch und ist sehr hydrolyseempfindlich. Als wichtige Nebenreaktion sei die Reaktion mit Alkoholen zu Sulfonsäureestern zu erwähnen. Aufgrund der höheren Nucleophilie reagieren Amine jedoch deutlich schneller und die entstehenden Sulfonsäureester sind anfällig gegenüber nucleophiler Substitution.[107,108] Die mit Aminen gebildeten Sulfonamide sind hingegen sehr stabil, so dass unter gegebenen Bedingungen keine Zersetzungsreaktionen zu erwarten sind. Das Fluorophor zeichnet sich, wie alle Rhodamin-Farbstoffe, durch hohe Photostabilität und Helligkeit aus. DMSO ist als Lösungsmittel zu vermeiden, da dieses mit der Sulfonylgruppe reagiert.[109] Absorptionsmaxima sind für Einphotonenanregung laut Herstellerangaben bei  $\lambda_{\text{ex}} = 369 \text{ nm}$  und  $587 \text{ nm}$  zu finden. Das Zweiphotonen-Absorptionsmaximum liegt laut Bestvater *et al.* bei rund  $1100 \text{ nm}$  für konjugiertes SR101, jedoch sind im Bereich  $800\text{-}830 \text{ nm}$  ähnlich hohe Absorptionswerte zu finden.[110] Für den absoluten Wert des Absorptionsquerschnitts gibt es noch keine veröffentlichten Daten, jedoch wird dies aufgrund der ähnlichen molekularen Struktur vergleichbar mit den Werten für Rhodamin B sein; hier werden bis zu  $210 \text{ GM}$  berichtet.[111] Das Maximum der Emission ist bei  $\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$  in Ethanol, beziehungsweise  $615 \text{ nm}$  an einen Antikörper konjugiert bei pH 7.4 zu finden.[110,112] In wässriger Lösung besitzt SR101 eine Fluoreszenzlebensdauer von  $4.2 \text{ ns}$ . [113] Die Quantenausbeute beträgt in Ethanol 0.9.

### 3.4.2 Probenherstellung und Labelingprozedur

Alle verwendeten Lösungsmittel sind von Sigma-Aldrich, Fluka oder Acros mit p.a.- oder HPLC-Reinheit bezogen worden und wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet. Sofern nötig, ist restliches Wasser durch wasserfreies Natriumsulfat entfernt worden.

#### *Labeling mit Fluorescamin und NBD-F*

Zur Behandlung von aminierten Polymerfolien wurde in einer Glasschale eine  $1 \text{ mM}$  Lösung von Fluorescamin für die Markierung von primären Aminen in trockenem Aceton auf die Folienstücke getropft und lichtdicht verschlossen. Bei dieser Konzentration wird das Fluorophor im großen Überschuss eingesetzt, damit die Reaktion möglichst quantitativ verläuft. Die Reaktion wurde nach mindestens  $5 \text{ min}$  Reaktionszeit durch mehrmaliges Waschen mit Aceton beendet. Anschließend wurden die Folien mit Stickstoff trocken geblasen. Die fluoreszenzmarkierten Folien sind im Dunklen unter  $\text{N}_2$ -Atmosphäre bei  $-18^\circ\text{C}$  (Tiefkühlschrank) mehrere Wochen haltbar. Zur Fluoreszenzmarkierung von primären und sekundären Aminen mit NBD-F wurde ebenfalls eine  $1 \text{ mM}$  Lösung verwendet. Nach Al-Majed und Al-Zehouri ist die optimale Reaktionstemperatur  $70^\circ\text{C}$  und die optimale

Reaktionszeit 10 min.[114] Da das Labeling von Folien bei 70 °C einige experimentelle Nachteile mit sich bringt, wurde die Reaktion bei Raumtemperatur durchgeführt und die Reaktionsdauer auf 40 min verlängert. Die weitere Probenpräparation erfolgte dann wie für Fluorescamin.

Zur Herstellung von Farbstofflösungen wurde das Fluorophor im Verhältnis 1.2:1 zum Amin eingesetzt, da dieses in beiden Fällen fluorogen ist. Für NBD-F Lösungen wird der Reaktionsansatz im Ölbad auf 70 °C erhitzt. Da beim NBD-F das Hydrolyseprodukt auch fluoresziert, muss unbedingt auf die Wasserfreiheit des Lösungsmittels geachtet werden, welche mit wasserfreiem  $\text{CuSO}_4$  oder  $\text{Cu(I)Cl}$  überprüft wurde.

Zum Labeling von Polyelektrolyten, speziell Polyallylamin (20 wt% Wasser,  $M \approx 17$  kDa, Aldrich) und lineares Polyethylenimin ( $M \approx 25$  kDa, Alfa Aesar), wird NBD-F in Cyclohexan gelöst und im Unterschuss (1:100) zum festen Polyelektrolyten gegeben. Das unpolare Lösungsmittel löst den Feststoff nicht an. Die Reaktion wurde 20 min bei 50 °C durchgeführt. Anschließend wurde die flüssige Phase abgezogen, mehrmals mit kaltem Cyclohexan gewaschen und der Feststoff anschließend getrocknet. Auf einem Objektträger wurde ein wenig vom gelabelten Polyelektrolyt gegeben und in einem hochsiedenden, unpolaren Lösungsmittel immigriert.

### *Doppellabeling*

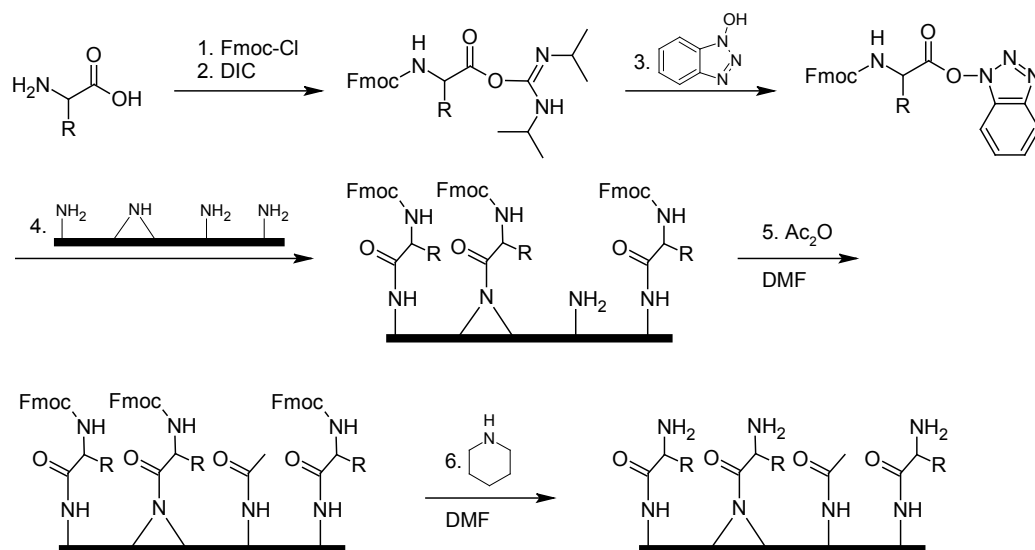
Zum Labeln der primären Amine mit OPA wurde eine 2 mM Lösung in Ethanol hergestellt sowie eine 3 mM Lösung von *n*-Butanthiol in Ethanol. Für NDA und KCN wurden methanolische Lösungen erstellt. Beide Lösungen wurden im Verhältnis 1:1 erst direkt vor der Reaktion zusammengegeben und damit das Substrat benetzt. Die Reaktion fand im Dunkeln bei Raumtemperatur statt, die Reaktionsdauer betrug mindestens 30 min. Anschließend wurde einmal mit Methanol, dann zweimal mit Ethanol und abschließend einmal mit Aceton gespült. Zum Labeln der sekundären Amine wurde eine 1 mM Lösung von SR101 in trockenem Ethanol zu den Substraten gegeben. Die Reaktion findet unter identischen Bedingungen statt. Anschließend wird dreimal mit Ethanol, einmal mit Aceton gespült und anschließend unter Stickstoffstrom trockengeblasen.

### *Herstellung von PP-Folien mit uniformen Aminogruppen*

Wenn Polymersubstrate durch Plasmabehandlung mit Aminogruppen funktionalisiert werden, so ist die Zusammensetzung aus primären und sekundären Aminen unbekannt. Um eine einheitliche Aminogruppenpopulation auf Oberflächen zu erreichen, lassen sich die Aminogruppen nach Ansätzen der Peptidsynthese behandeln. Dies wurde am Helmholtz Zentrum für



Infektionsforschung nach dem DIC-HOBt-Verfahren durchgeführt. Das Prinzip ist vereinfacht in Abbildung 19 dargestellt.



**Abbildung 19:** Festphasen-Spotsynthese zur Herstellung uniformer Aminogruppen.

Um selektiv primäre Aminogruppen zu erhalten, wurden Glycin oder die biogene Aminosäure  $\beta$ -Alanin verwendet, für sekundäre Aminogruppen Prolin. Im ersten Reaktionsschritt wurde die terminale Aminogruppe mit Fluorenylmethyloxycarbonylchlorid (Fmoc-Cl) geschützt. Danach wurde die relativ reaktionsträge Carbonsäuregruppe aktiviert; zuerst mit  $N,N'$ -Diisopropylcarbodiimid (DIC), anschließend mit Hydroxybenzotriazol (HOBt, 3.). Die aktivierte Aminosäure wurde dann mit den Aminogruppen auf der Polymeroberfläche umgesetzt. Um eventuell nicht umgesetzte Aminogruppen zu deaktivieren, wurden diese mit Acetanhydrid ( $\text{Ac}_2\text{O}$ , 5.) acetyliert. Abschließend wurde die Schutzgruppe mit Piperidin entfernt (Schritt 6). Für Details sei auf die Arbeiten von Frank *et al.* verwiesen.[29,115,116]

#### Herstellung von PP-Kalibrierproben

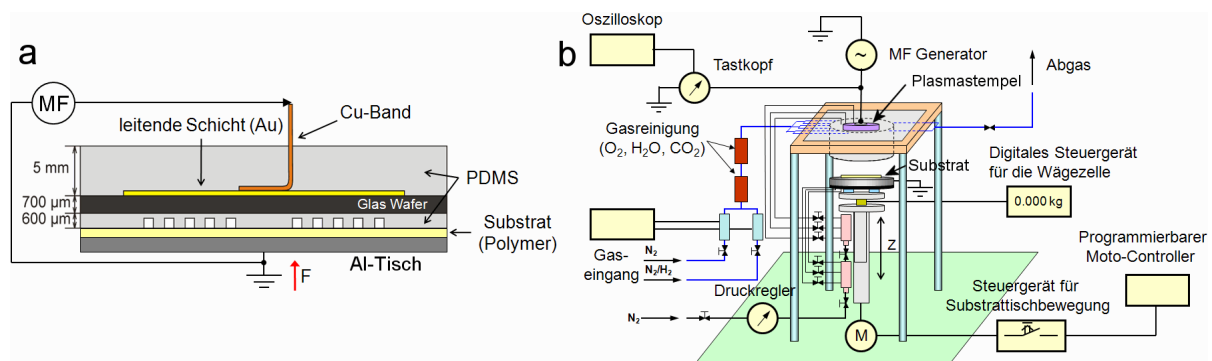
Zur absoluten Bestimmung der Aminkonzentration wurde lösliches Polypropylen (PP) verwendet (Firma Polysciences,  $M \approx 100$  kDa,  $M_w/M_n < 3.4$ ). Zur Aufreinigung wurde PP mit circa 1 mL *p*-Xylol pro 10 mg PP bei 110-120 °C unter starkem Rühren in Lösung gebracht.[117] Dann wurde mit mindestens dem gleichen Volumen an Methanol das PP ausgefällt. Der Ansatz wurde abgekühlt und die Flüssigkeit abzentrifugiert. Anschließend wurde mit Aceton gewaschen und erneut zentrifugiert. Die erhaltenen PP-Flocken wurden bei 80 °C mehrere Stunden getrocknet. Zu Herstellung von PP-Proben mit definiertem Amingehalt wurde eine vorher eingewogene Menge an PP erneut in Lösung gebracht. Dann wurde in einem möglichst geringen Volumen unter Rühren eine bestimmte Menge an NDA-Octylamin Addukt (*N*-Octyl-1-cyanobenz[*f*]isoindol) beziehungsweise SR101-Dibutylamin

Addukt (*N,N*-Dibutylsulfonamid) gegeben, so dass das PP noch in Lösung blieb. Die PP-Farbstoff-Lösung wurde auf einem Objektträger eingedampft, bis sich, je nach Präparation, eine weiße Schicht beziehungsweise ein transparenter Film einiger Mikrometer Dicke gebildet hat.

### 3.5 Herstellung plasma-aminierter Polymersubstrate

Die Untersuchung von Aminogruppen mit einer ortsselektiven DBD-Plasmabehandlung von Polymeroberflächen bei Atmosphärendruck erfolgte im Rahmen der von der VolkswagenStiftung geförderten Projekte „Microstructured Surface Treatment by Atmospheric-Pressure Microplasmas“ und „Plasma Printing of Thin Films with Porous Metal Electrodes – P<sup>3</sup>M“. Die ortsselektive Behandlung wurde durch eine PDMS-Maske (Polydimethylsiloxan) erreicht. Durch Anpressen der Maske auf das Substrat entstehen Gashohlräume beziehungsweise Kavitäten, die mit einem entsprechenden Prozessgas geflutet sind. PDMS ist ein flexibles Material, welches Unebenheiten der Substratoberfläche ausgleichen kann und damit für eine klar definierte Abgrenzung des Hohlraums sorgt, sowie auch die Entstehung von Hohlräumen zwischen den Kavitäten des Stempels verhindert.

Im erstgenannten Projekt wurden Plasmastempel mit während des Plasmaprozesses abgeschlossenen Kavitäten verwendet (Abbildung 20 a). Design, Herstellung und Charakterisierung der PDMS-Stempel erfolgte durch die Arbeit von Frau Lucas am IMT. Details sind den zitierten Veröffentlichungen von Lucas *et al.* zu entnehmen.[116,118–120]

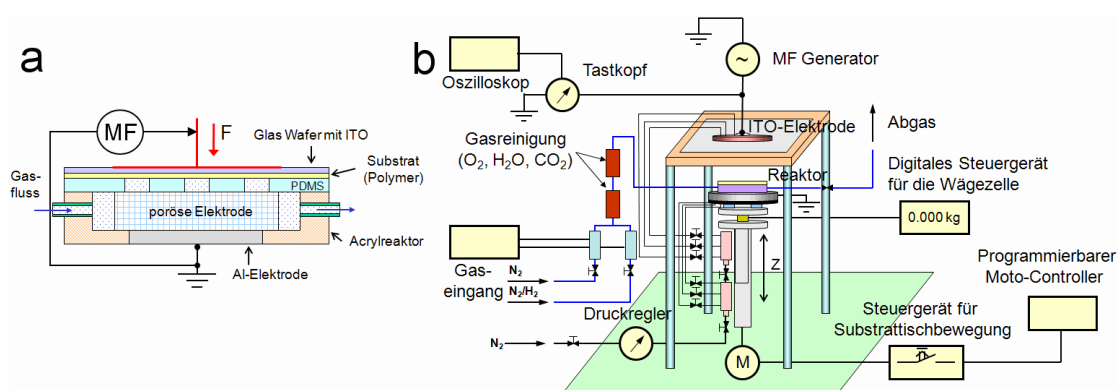


**Abbildung 20:** a) HV-Design eines PDMS-Plasmastempels mit während des Plasmaprozesses geschlossenen Kavitäten; b) Aufbau der Plasmaprintinganlage am IOT für die Verwendung der Plasmastempel aus a).

Es wurden zwei Stempeldesigns für den Einsatz mit Niederspannung (*low voltage*, LV) und Hochspannung (*high voltage*, HV) konzipiert. In Experimenten stellte sich heraus, dass mit dem HV-Design die besten Resultate erzielt werden konnten, so dass auch alle in Kapitel 4.1 gezeigten Ergebnisse mit HV-Stempeln erzeugt wurden. Für das Plasmaprinting wurde eine Anlage am IOT konzipiert und betrieben, die in Abbildung 20 b skizziert ist.[31,121] Über eine geregelte Gaszufuhr wurde eine Mischung aus 4% Wasserstoff und

96% Stickstoff (sogenanntes Formiergas) in den Zwischenraum von Plasmastempel und zu behandelndes Substrat eingebracht. Als Substrate kamen biaxial verstrecktes Polypropylen (BOPP, Goodfellow GmbH, 75  $\mu\text{m}$ ), Composite aus PP mit 22.5 wt% Kohlenstoffruß (PP/C204, CESA® conductive granulate, Clariant GmbH, 1.5 mm) und PP-Membrane (Whatman Inc., 160  $\mu\text{m}$  Dicke, Porengröße 0.2  $\mu\text{m}$ ) zum Einsatz. Alle Substrate wurden mehrfach mit Isopropanol und Aceton vorgereinigt, um dem Kunststoff zugefügte Additive auf der Oberfläche möglichst vollständig zu entfernen. Nach ausreichend langer Spülzeit mit dem Prozessgas werden Stempel und Substrat durch eine Motorisierung zusammengepresst. Ein Mittelfrequenzgenerator mit einer Frequenz von 23 kHz und einer Spitzenspannung von 10.5 kV für PP/C-Composite und 10-10.8 kV für PP-Membrane erzeugte die Plasmaentladung in den Kavitäten des Plasmastempels. Die Behandlungsdauer betrug einheitlich drei Sekunden.

Im zweiten Projekt, das auf die Erkenntnisse aus dem ersten Projekt aufbaut, wurden durch ein poröses Metallvlies als Elektrode offene Kavitäten konzipiert, die eine kontinuierliche Gaszufuhr während der Plasmabehandlung erlauben. Dadurch kann einerseits durch Verwendung von Precursor-Materialien eine plasmagestützte Abscheidung von dünnen Polymerfilmen auf der Substratoberfläche realisiert werden. Zum anderen ist durch zwei separate Gaseinlässe die Erzeugung von Behandlungsgradienten auf der Substratoberfläche möglich, was aber erst Gegenstand zukünftiger Forschung sein wird. Außerdem können durch die kontinuierliche Gaszufuhr höhere Aminogruppendichten erzielt werden. Der Aufbau eines solchen Plasmareaktors ist in Abbildung 21 a gezeigt.

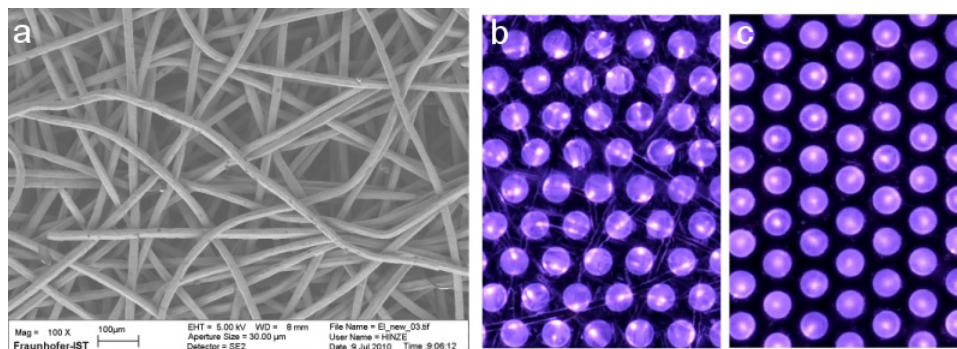


**Abbildung 21:** a) HV-Design eines Acrylreaktors mit poröser Metallelektrode und PDMS-Maske für kontinuierlichen Gaszufluss während des Plasmaprozesses; b) Aufbau der Plasma-Printinganlage am IOT für die Verwendung der Reaktoren aus a).

Design, Herstellung und Charakterisierung der PDMS-Stempel ist durch Herrn Marchesseault am IMT erfolgt. Details sind auch hier der zitierten beziehungsweise zukünftigen Veröffentlichungen zu entnehmen.[122] Die Plasma-Printinganlage wurde für den Einsatz der beschriebenen Reaktoren minimal modifiziert (Abbildung 21 b). Für die

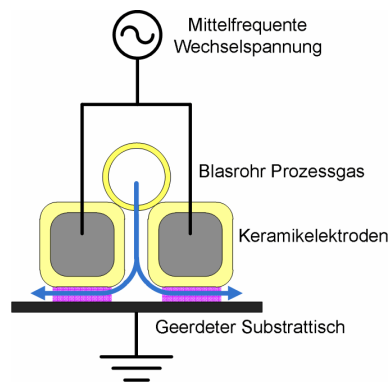
Plasmabehandlung wurde eine Spitzenspannung von 6-6.5 kV eingesetzt. Die Behandlungsdauer betrug für die untersuchten PP-Membrane 3 s, für die BOPP-Folien von 5 s bis zu 30 s.

Die poröse Metallelektrode besteht aus einer versinterten Faserstruktur aus gezogenen Chrom-Nickel-Stahlfasern (Fraunhofer IFAM). In Abbildung 22 a sind die für die poröse Metallelektrode verwendeten Fasern in einer REM-Aufnahme zu erkennen. In der ersten Lieferung vom Fraunhofer IFAM besaßen die Fasern eine breite Größenverteilung von 10-200  $\mu\text{m}$ . Bei einem Kavitätendurchmesser von 500  $\mu\text{m}$  ergeben sich so stark inhomogene Entladungen innerhalb der Kavitäten (Abbildung 22 b), die auch in einer inhomogenen Aminogruppenverteilung resultieren. Abhilfe geschaffen werden konnte durch das Einbringen eines feinmaschigen Metallgewebes zwischen den Fasern und dem Polymer (Abbildung 22 c). Die Entladung ist in der Mitte und direkt am Rand der kreisförmigen Kavitäten am stärksten, so wie es vom Projektpartner des HTEE simuliert wurde. Mit denen in der zweiten Lieferung erhaltenen 25  $\mu\text{m}$ -Fasern konnte eine homogene Behandlung erzielt werden; die Verteilung der optischen Emission im Plasma wird ähnlich sein zu der mit dem Metallgewebe aufgenommenen.



**Abbildung 22:** a) REM-Aufnahme von 25  $\mu\text{m}$ -Fasern einer porösen Metallelektrode; b) optische Emission aus den Kavitäten eines Plasmastempels mit Faserstrukturen von 10-200  $\mu\text{m}$ ; c) optische Emission bei der gleichen Faserstruktur mit zusätzlichem 7  $\mu\text{m}$  Metallgewebe (Quelle: alle Hinze, IOT, TU Braunschweig).

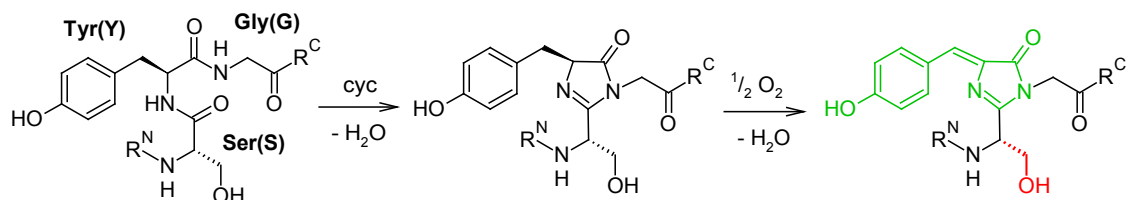
Die Plasmabehandlung der in dieser Arbeit untersuchten PET- und Baumwollfasern erfolgte auch im DBD-Verfahren, allerdings nicht ortsselektiv mit einem Plasmastempel, sondern ganzflächig wie in Abbildung 23 schematisiert. Die spannungsführende Elektrode ist mit Keramik als Dielektrikum ummantelt. Über eine Gasdusche wurde das Prozessgas, bestehend aus 97% Stickstoff und 3% Wasserstoff, in die Plasmazone eingebracht. Die Anlage wurde gleichzeitig mit Stickstoff umspült, um Sauerstoff aus der Prozesszone herauszuspülen. Über Bewegung des Elektrodenkopfs oder Substrattisches kann eine Plasmabehandlung großer Flächen realisiert werden.



**Abbildung 23:** DBD-Anlage zur Behandlung von Fasern (Quelle: Baranski, Fraunhofer IST, Braunschweig).

### 3.6 Fluorophore Gruppe der Grün fluoreszierenden Proteine (GFP)

Die Klasse der fluoreszierenden Proteine im sichtbaren Bereich (*visible fluorescent proteins*, VFP, zur Unterscheidung der Autofluoreszenz von einzelnen Aminosäuren) besitzt eine chromophore Gruppe, die posttranslatorisch autokatalytisch induziert ist.



**Abbildung 24:** Autokatalytische Bildung der chromophoren Gruppe im GFP-Wildtyp (wt-GFP) durch die Aminosäuren S65-Y66-G67.  $R^N$  geht Richtung N-Terminus,  $R^C$  Richtung C-Terminus. In der Struktur rechts ist die entstandene chromophore Gruppe des GFP grün hervorgehoben. Die rot markierte Seitenkette der Aminosäure 65 markiert die Unterschiede der einzelnen im Text beschriebenen GFP-Variationen.

Für den Wildtyp sind die Aminosäuren S65-Y66-G67 für die Bildung der chromophoren Gruppe verantwortlich.[123] Durch Wechselwirkung mit räumlich benachbarten Aminosäuren wird eine Ringschlussreaktion unter Abspaltung von Wasser induziert. Daran anschließend findet eine Eliminierung an zwei Kohlenstoffatomen zu einer Doppelbindung statt, der die Konjugation von Phenylring und Imidazolidonring herstellt. Die entstandene chromophore Gruppe kann als 4'-Hydroxybenzyliden-2,3-(R,R')imidazolidon bezeichnet werden. Ausgehend von der gelösten Tertiärstruktur des Wildtyps sind zahlreiche Punktmutationen durchgeführt worden.[124] Eine oft verwendete GFP-Variation ist das EGFP (*enhanced*), wo bei der chromophoren Gruppe der Austausch von Serin durch Threonin erfolgt ist, das im Vergleich zu Serin eine zusätzliche Methylgruppe an der 3-Position der Aminosäure besitzt. Das in dieser Arbeit verwendete mTagGFP besitzt die Mutation S65C an der chromophoren Gruppe, so dass anstelle der Hydroxygruppe eine Mercaptogruppe vorzufinden ist.[125,126] TurboGFP ist S65G mutiert und besitzt somit an dieser Stelle keine Seitenkette.[127] Obwohl die Seitenkette der Aminosäure 65 nicht Bestandteil der chromo-

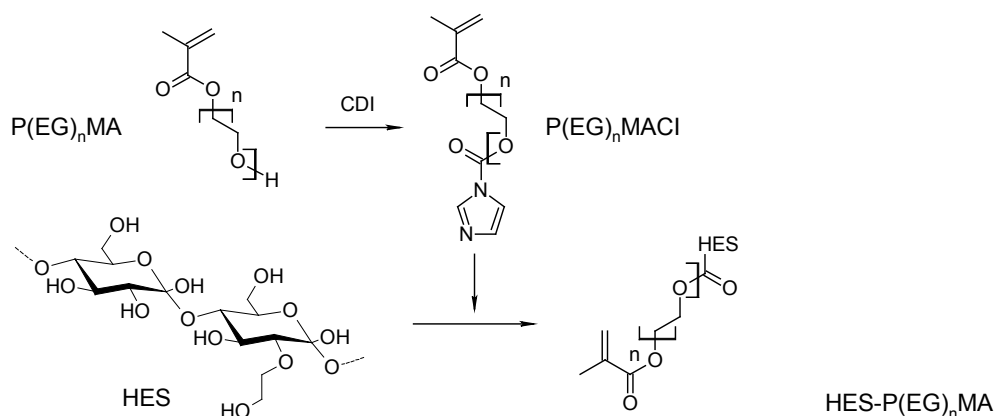
phoren Gruppe ist, beeinflusst sie aufgrund ihrer kovalenten Anbindung die photophysikalischen Eigenschaften der GFP-Varianten.

Für EGFP wird von Blab *et al.* ein Wirkungsquerschnitt für die Zweiphotonenabsorption von 41 GM bei 920 nm berichtet, Heikal *et al.* haben bei 960 nm sogar 75 GM gemessen.[128,129] Das Einphotonen-Absorptionsmaximum liegt bei  $\lambda_{\text{ex}} = 489$  nm. mTagGFP besteht aus 238 Aminosäuren, besitzt ein Gewicht von 27 kDa und liegt als Monomer in Lösung vor.[126,130] Das Einphotonen-Absorptionsmaximum liegt bei  $\lambda_{\text{ex}} = 483$  nm, das Emissionsmaximum bei  $\lambda_{\text{em}} = 506$  nm, die Quantenausbeute beträgt 0.6. Die phenolische Gruppe des Chromophors besitzt einen  $\text{pK}_a$  von 5.0. TurboGFP besteht aus 232 Aminosäuren, besitzt ein Gewicht von 26 kDa und liegt in Lösung als Dimer vor.[127,131] Das Einphotonen-Absorptionsmaximum liegt bei  $\lambda_{\text{ex}} = 482$  nm, das Emissionsmaximum bei  $\lambda_{\text{em}} = 502$  nm, die Quantenausbeute beträgt 0.53. Die phenolische Gruppe des Chromophors besitzt einen  $\text{pK}_a$  von 5.2. Ein Vergleich mit den Daten von Patterson *et al.* legt nahe, dass für mTagGFP und TurboGFP ein ähnlich hoher Wirkungsquerschnitt für die Zweiphotonenabsorption wie für das EGFP bestimmt angenommen werden kann.[124]

Aufgrund des aciden Charakters des phenolischen Protons der chromophoren Gruppe liegt ein Gleichgewicht zwischen neutraler und deprotonierter Form vor, die die photophysikalischen Eigenschaften des GFP beeinflusst. Für das EGFP ist die starke langwellige Absorptionsbande der deprotonierten Form zuzuschreiben, die schwächere kurzwellige der protonierten Form. Sie verschieben sich in Abhängigkeit des pH-Werts relativ zueinander.[129,132] Es wird vermutet, dass die Emission nur aus der deprotonierten Form erfolgt, da das Fluorophor im angeregten Zustand stärker acide ist.[133] Eine solche protolytische Reaktion angeregter Zustände wurde bereits 1949 von Förster beschrieben.[134] Bei neutralem pH-Wert liegen sowohl mTagGFP, als auch TurboGFP fast ausschließlich in der deprotonierten Form vor und erzielen daher maximale Helligkeit. Eine weitere Konsequenz dieser besonderen Eigenschaft des GFP-Fluorophors ist das Auftreten von zwei Fluoreszenzlebensdauern. Die genaue Aufklärung der dafür involvierten angeregten Zustände stehen noch unter Diskussion; es werden intermediäre Zustände und Protonentransfer im angeregten Zustand in Erwägung gezogen.[129,135–137] Allerdings konnte gezeigt werden, dass bei langwelliger Anregung der relative Anteil der langen Lebensdauer steigt, sowie auch beim längerwelligen Anteil der Fluoreszenz.[136] Daher ist es bei der Beobachtung der Fluoreszenzanisotropie von GFP von Vorteil, eine möglichst langwellige Anregung zu benutzen und auch die Fluoreszenzfilter entsprechend zu wählen, um einen möglichst großen Anteil der langen Fluoreszenzlebensdauer zu detektieren.

### 3.7 Herstellung Farbstoff-gelabelter Hydrogele

Die Synthese der für die Hydrogele verwendeten Polymere sowie die Herstellung von Hydrogelscheiben erfolgte am Institut für Technische Chemie, Abteilung Makromolekulare Chemie der TU Braunschweig. Zur Herstellung der Hydrogele wurde Hydroxyethylstärke (HES, Fresenius Kabi Deutschland,  $M = 130$  kDa,  $DS = 0.4$ ) durch Polyethylenglykol-methacrylat-Seitenketten (PEGMA) modifiziert. Die terminalen Methacrylatgruppen können unter Einwirkung eines Photoinitiators miteinander radikalisch polymerisieren und damit die Polymerketten quervernetzen.



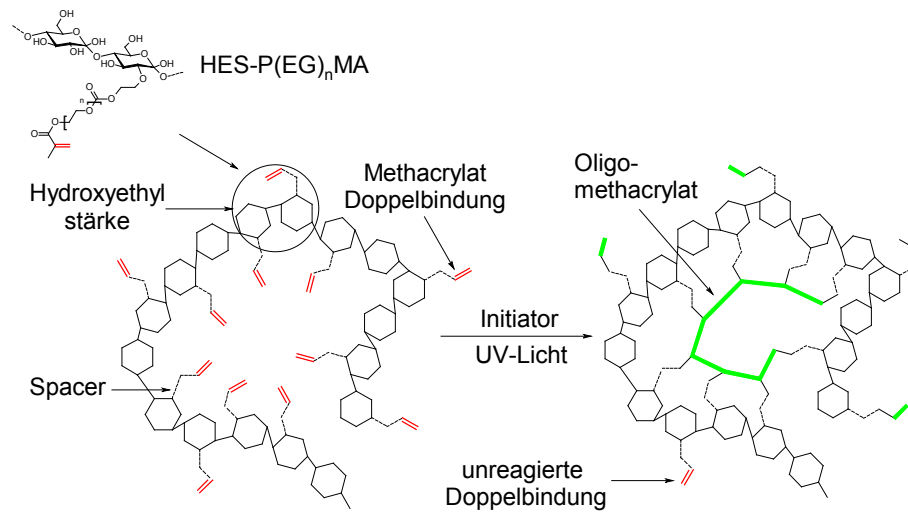
**Abbildung 25:** Herstellung des HES-P(EG)<sub>n</sub>MA Polymers.

Das kommerziell erhältliche Polyethylenglykolmethacrylat wurde mittels Carbonyldiimidazol (CDI) aktiviert. Dieses reagiert dann mit freien Hydroxygruppen der Hydroxyethylstärke (HES) zum Zielpolymer. Aus sterischen Gründen reagiert bevorzugt die Hydroxygruppe des Hydroxyethylrestes. Der Substitutionsgrad (*degree of substitution*, DS) kann durch Eduktverhältnisse und Reaktionszeit beeinflusst werden und nach der Reaktion analytisch durch  $^1\text{H-NMR}$  bestimmt werden.[138]

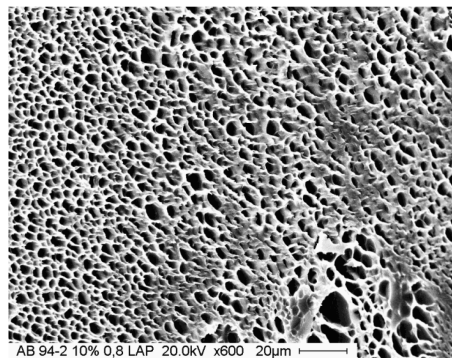
Das Grundprinzip der Quervernetzung soll kurz mithilfe von Abbildung 26 erläutert werden. Das HES-P(EG)<sub>n</sub>MA Polymer wird zusammen mit einem radikalischen Photoinitiator und dem Sensormolekül gelöst. Die rot hervorgehobenen Doppelbindungen der Methacrylatgruppe aus den Seitenketten stehen für eine Polymerisation zur Verfügung. Durch Aktivierung des Photoinitiators durch UV-Licht werden Radikale erzeugt, die die Verknüpfung räumlich nahe zueinander stehender Methacrylatgruppen initiieren. Dadurch bilden sich Oligomethacrylate, die Glucose-Einheiten innerhalb einer Polymerkette und auch zwischen verschiedenen Polymerketten verbinden. Dadurch wird eine Quervernetzung erzielt und es bildet sich ein dreidimensionales Polymernetzwerk aus. In den Poren beziehungsweise Kavitäten des Netzwerks befinden sich die immobilisierten Sensormoleküle. Die Struktur eines solchen Polymernetzwerks ist gut in einer REM-Aufnahme eines Hydrogels zu erahnen.



Die in Abbildung 27 gezeigte Aufnahme spiegelt jedoch nicht die reale Struktur im intakten Hydrogel wieder, da durch die notwendige Gefrier Trocknung feine Polymerstrukturen durch die Eisbildung zerstört werden können.



**Abbildung 26:** Schematische Darstellung der Quervernetzung eines HES-P(EG)<sub>n</sub>MA Polymers durch photoinduzierte radikalische Polymerisation von Methacrylatgruppen.

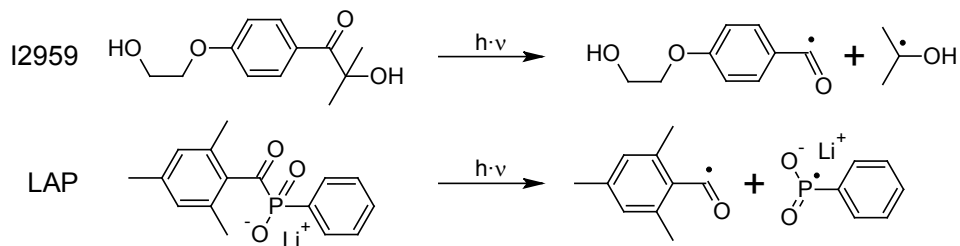


**Abbildung 27:** REM-Aufnahme eines gefriergetrockneten HES-P(EG)<sub>6</sub>MA/DS0.044-Hydrogels mit 10% Polymergehalt und LAP als Initiator (Quelle: Bertz, Institut für Technische Chemie, TU Braunschweig).

Die Hydrogelscheiben wurden mit einer pH 7.4 Pufferlösung hergestellt. In dieser wurden 0.01 wt% LAP beziehungsweise 0.015 wt% Irgacure®2959 (I2959, Ciba® Specialty Chemicals Inc.) als Initiator und 10-30 wt% HES-P(EG)<sub>n</sub>MA gelöst. Zusätzlich beinhaltete die Lösung 50 µM Farbstoff beziehungsweise 0.4 oder 0.8 µM GFP. Als organischer Farbstoff wurde Cumarin 314 (2,3,5,6-1*H*,4*H*-Tetrahydro-9-carbethoxyquinolizino-[9,9a,1-*gh*]cumarin, C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>4</sub>) verwendet. Als fluoreszierende Proteine wurden das monomere mTagGFP (als TagGFP2 gelistet, aus *Aequorea macrodactyla*)[125] und das dimere TurboGFP (Variante von ppluGFP2 aus *Pontellina plumata*, beide Firma Evrogen)[127] benutzt. 500 µL der Lösung reichen für eine circa 2×2 cm<sup>2</sup> große Gelscheibe aus. Die Lösung wurde unter UV-Licht (366 nm, 3.0 mW·cm<sup>-2</sup>) 30 min lang bestrahlt. Die Struktur und Photo-reaktion der Initiatoren ist in Abbildung 28 dargestellt. Beide Initiatoren zeichnen sich durch



geringe Zytotoxizität in dem verwendeten Konzentrationsbereich und damit hohe Biokompatibilität aus.[139]

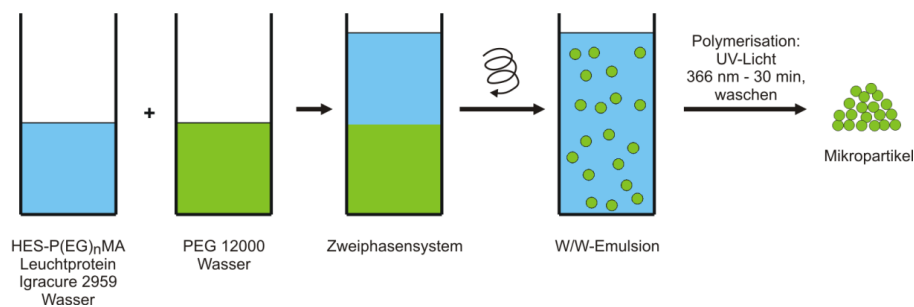


**Abbildung 28:** Photolytische Reaktion der Initiatoren LAP und I2959.

Auf die auf einem Objektträger liegende Gelscheibe wurde nach der Quervernetzung ein Deckgläschen gelegt und angedrückt. Überstehendes Gel wurde mit einem Skalpell abgeschnitten und das Deckgläschen mit Klebefilm fixiert. Eine Lagerung der Gelscheiben fand im Dunklen unter hoher Luftfeuchtigkeit im Kühlschrank statt, wodurch sie mehrere Wochen stabil waren. Alle Messungen wurden circa 10-15  $\mu\text{m}$  unter der Geloberfläche durchgeführt.

### Mikropartikelherstellung

Die Herstellung von Mikropartikeln erfolgte am Institut für Pharmazeutische Technologie der TU Braunschweig nach dem von Schwoerer *et al.* vorgestellten Verfahren, das auch in Abbildung 29 dargestellt ist.[47] Dabei wurde dasselbe Polymer wie für die Hydrogelscheiben verwendet.



**Abbildung 29:** Schematische Darstellung des Herstellungsverfahrens für Hydrogel-Mikropartikel.

Die Mikropartikel wurden in einer Wasser-Wasser-Emulsion hergestellt. Der Ansatz der untersuchten Partikel bestand aus 9.9 g 2%ige Polymerlösung (HES-P(EG)<sub>6</sub>MA, DS 0.044) mit 0.01% I2959 als Photoinitiator und 6 g 30%ige Polyethylenglykol(PEG)-Lösung. Zusätzlich befanden sich in der Polymerlösung noch 15  $\mu\text{l}$  mTagGFP. Aufgrund einer Mischungslücke bildet sich beim Zusammengeben der beiden wässrigen Phasen ein Zweiphasensystem. Durch starke Durchmischung lässt sich eine Emulsion erzeugen. Mittels UV-Licht-Bestrahlung wurde das Polymer quervernetzt und die Hydrogel-Mikropartikel entstehen. Nach erfolgreicher Separation und Reinigung konnten diese dann analysiert werden. Für die in dieser Arbeit

untersuchten Mikropartikel wurde der Median der Partikelgrößenverteilung mit 9.7  $\mu\text{m}$  bestimmt (Laserlichtstreuung).

### 3.8 Statistik zur Datenauswertung

#### *Fehlerfortpflanzung in $r$ und $F$*

Die Zählung von einzelnen Photonen gehorcht einer Poissonstatistik. Somit besitzt ein Zeitkanal mit  $N$  counts eine Messunsicherheit von  $\sqrt{N}$  counts. Die Berechnung der Anisotropie  $r$  unter Berücksichtigung des Gerätefaktors  $G$  (vergleiche Gleichung (3-3)) ergibt eine Abhängigkeit von vier fehlerbehafteten Variablen, wie in Gleichung (3-4) ersichtlich wird.

$$r = \frac{VV - G \cdot VH}{VV + 2G \cdot VH} = \frac{VV - \sqrt{\frac{VV \cdot HV}{VH \cdot HH}} \cdot VH}{VV + 2\sqrt{\frac{VV \cdot HV}{VH \cdot HH}} \cdot VH} \quad (3-4)$$

Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist die Bezeichnung der Intensität  $I$  weggelassen und nur die Subskripte sind dargestellt. Für die aus parallelen und senkrechten Kanal errechnete Gesamtfluoreszenz  $F$  ergibt sich eine ähnliche Abhängigkeit.

$$F = VV + 2G \cdot VH = VV + 2\sqrt{\frac{VV \cdot HV}{VH \cdot HH}} \cdot VH \quad (3-5)$$

Obwohl die Messunsicherheit der Intensität durch Poissonstatistik determiniert ist, wird für die Fehlerfortpflanzung eine Normalverteilung der Messwerte angenommen. Diese Näherung ist zulässig, da die Poissonverteilung für große Erwartungswerte  $\lambda$  gegen eine Normalverteilung läuft. Bereits für  $N = 50$  counts ist der relative Fehler kleiner als 1%. In den allermeisten Fällen sind in jedem Zeitkanal mindestens 100 counts vorhanden. Durch das Gauß'sche Fehlerfortpflanzungsgesetz für normalverteilte Unsicherheiten ergibt sich die Unsicherheit bei der Bestimmung der Anisotropie und totalen Fluoreszenz nach Gleichung (3-6) und (3-7).

$$\sigma_r = \frac{3}{2} \sqrt{\frac{HV \cdot VH(HH + HV) + HH \cdot VV(HV + VH)}{16HV^2 \cdot VH^2 + 8HH \cdot HV \cdot VH \left( 3VV + 4\sqrt{\frac{HV \cdot VH \cdot VV}{HH}} \right) + HH^2 \cdot VV \left( VV + 8\sqrt{\frac{HV \cdot VH \cdot VV}{HH}} \right)}} \quad (3-6)$$

$$\sigma_F = \sqrt{\frac{HV \cdot VH}{HH} + \frac{(HH + HV)(HH + VH)VV}{HH^2}} + 2\sqrt{\frac{HV \cdot VH \cdot VV}{HH}} \quad (3-7)$$

In dieser Berechnung wird ein  $G$ -Faktor für jeden Zeitkanal berechnet. Im Allgemeinen kann man jedoch davon ausgehen, dass der  $G$ -Faktor zeitunabhängig ist, da die Detektion nicht in irgendeiner Verbindung beziehungsweise Abhängigkeit zum Laserpuls steht. Aus praktischen Gründen, die in Abschnitt 4.2.1.2 näher erläutert werden, wurde für GFP-

Messungen ein arithmetischer Mittelwert aus einigen Zeitkanälen kurz nach dem Laserpuls gebildet. Somit wird aus dem zeitabhängigen  $G$  in Gleichung (3-4) und (3-5) ein gemittelter  $G$  in Gleichung (3-8).

$$r = \frac{VV - \bar{G} \cdot VH}{VV + 2\bar{G} \cdot VH} \quad \text{und} \quad F = VV + 2\bar{G} \cdot VH \quad (3-8)$$

Die einzelnen Werte für  $G$  sind natürlich auch fehlerbehaftet, so dass sich für jeden in die Mittelung eingehender Wert von  $G$  eine Unsicherheit wie folgt ergibt:

$$\sigma_{G(t)} = \frac{\sqrt{HV \cdot VH \cdot VV + HH(VH \cdot VV + HV(VH + VV))}}{2HH \cdot VV} \quad (3-9)$$

Die Unsicherheit für den Mittelwert von  $G$  errechnet sich leicht nachvollziehbar. Diese geht dann in die Fehlerfortpflanzung für die Anisotropie  $r$  und die totale Fluoreszenz  $F$  gemäß den Gleichungen (3-10) und (3-11) ein.

$$\sigma_r = \frac{3\sqrt{VH \cdot VV \left( \sigma_G^2 \cdot VH \cdot VV + \bar{G}^2 (VH + VV) \right)}}{(2\bar{G} \cdot VH + VV)^2} \quad (3-10)$$

$$\sigma_F = \sqrt{4\bar{G}^2 \cdot VH + 4\sigma_G^2 \cdot VH^2 + VV} \quad (3-11)$$

Diese Fehlerbetrachtung geht dann in die Darstellung der zeitabhängigen Größen  $r(t)$  und  $F(t)$  für jeden Datenpunkt ein. Die errechneten Fehler fließen in eine gewichtete nichtlineare Funktionsanpassung (*weighted non-linear fit*) ein. Es wird die Methode der kleinsten Fehlerquadrate (*least-squares*) durch einen Levenberg-Marquardt Algorithmus angewendet.[140,141] Die Funktionsanpassung erfolgt mit dem Programm OriginPro 8 der Firma OriginLab. Als Gütezahl für den Fit dient die Größe  $\chi^2$ , die für eine gute Funktionsanpassung nahe bei Eins liegt.

#### *Erwartungswert und Stichprobenvarianz*

Bei der Vermessung einer Probe wird aus den Messdaten eine physikalische Größe bestimmt. Bei den Hydrogeluntersuchungen wären das die Parameter des Anisotropiezerfalls, bei den plasmabehandelten Polymerfolien werden Tiefenprofile aufgenommen und daraus Behandlungstiefen bestimmt. Die Natur dieser Substrate beinhaltet Heterogenitäten, die eine Streuung und somit Verteilung der zu bestimmenden physikalischen Größe über die reine statistische Unsicherheit hinaus zur Folge haben. Die Einzelmessungen sind somit Stichproben aus einer Gesamtmenge. Der aus der Stichprobenmenge errechnete Erwartungswert

für die jeweilige Probe wird aus den mit den errechneten Unsicherheiten gewichteten Einzelwerten nach Gleichung (3-12) bestimmt.

$$\langle x \rangle = \frac{\sum_i w_i \cdot x_i}{\sum_i w_i}; \quad w_i = \frac{1}{\sigma_i^2} \quad (3-12)$$

Die Wichtung erfolgt also über den Kehrwert der Varianz. Die Varianz des Erwartungswertes lässt sich am besten mit einem erwartungstreuen Schätzer (*unbiased estimator*) und einer Wichtung der Fehlerquadrate errechnen.

$$s^2 = \frac{\sum_i w_i}{\left(\sum_i w_i\right)^2 - \sum_i w_i^2} \cdot \sum_i w_i (x_i - \langle x \rangle)^2 \quad (3-13)$$

### Hypothesentest

Aus mehreren Einzelmessungen erhält man für eine Probe wie oben erläutert einen Erwartungswert mit Unsicherheit. Um objektiv zu beurteilen, ob sich zwei Proben, bei denen zum Beispiel ein Parameter variiert, unterscheiden, bedient man sich eines Hypothesentests. Es wird die Hypothese aufgestellt, dass sich zwei zu vergleichende Proben nicht unterscheiden lassen (Nullhypothese) und versucht zu zeigen, dass diese Hypothese widerlegt werden kann. Dies geschieht durch einen Zweistichproben-t-Test:

$$|\langle x_1 \rangle - \langle x_2 \rangle| \leq t \cdot s_p \sqrt{1/N_1 + 1/N_2} \quad (3-14)$$

Dabei ist  $N_i$  die Stichprobengröße,  $s_p$  die gewichtete Varianz, die sich aus Gleichung (3-15) errechnet,

$$s_p^2 = \frac{(N_1 - 1)s_1^2 + (N_2 - 1)s_2^2}{N_1 + N_2 - 2}, \quad (3-15)$$

und  $t$  ergibt sich aus Tabellenwerken für die Student-t-Verteilung. Hierbei müssen die Freiheitsgrade, das gewünschte Konfidenzintervall und die Ein- oder Zweiseitigkeit des Tests vorgegeben werden.

## Kapitel 4      ERGEBNISSE UND DISKUSSION

### 4.1    Dreidimensionale Darstellung von Aminogruppen auf          plasmabehandelten Polymeroberflächen

Für die allermeisten Messungen in Kapitel 4.1 werden orts aufgelöste Intensitätsbilder der zweiphotonen-induzierten Fluoreszenz aufgenommen. Die Intensitätsbilder sind integrale Intensitätsbilder, also ohne Zeitauflösung. Die so erhaltenen Bilder sind reine Graustufenbilder; es werden alle Wellenlängen detektiert, die die verwendeten Fluoreszenzfilter passieren können. Die Intensitätsbilder werden in dieser Arbeit aber als Falschfarbenbilder dargestellt. Dabei wird die Intensitätsskala „Red Hot“ des Programms ImageJ verwendet (Abbildung 30, I).[142] Durch die zusätzliche Farbinformation ist es für den Betrachter leichter Strukturen zu erkennen als beim Graustufenbild und gerade Intensitätswerte im unteren, das ist hier der rote Bereich, werden für das menschliche Auge durch zusätzlichen Kontrast deutlicher sichtbar. Es sei allerdings nochmals darauf hingewiesen, dass die gezeigten Farben nichts mit der tatsächlichen Farbe der Fluoreszenz zu tun haben.

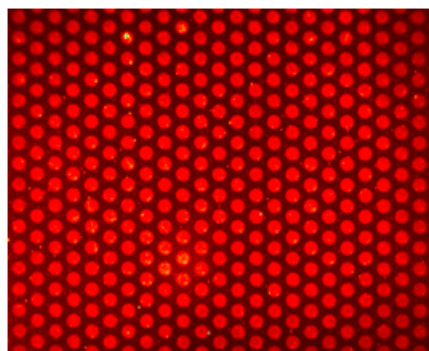


**Abbildung 30:** Verwendete Falschfarbenskalen für Intensitätsdaten ( $I$ ), Fluoreszenzlebensdauer-Daten ( $\tau$ ) und Anisotropie-Daten ( $r$ ). Dabei ist der minimale Wert am linken und der maximale Wert am rechten Ende.

Für Fluoreszenzlebensdauer-Bilder wird eine Falschfarbenskala mit noch mehr Farbwerten verwendet („Fire“, Abbildung 30,  $\tau$ ). Hier entsprechen die Pixelwerte im Bild nicht mehr einer Intensität, sondern einer Fluoreszenzlebensdauer. Für die Darstellung mittlerer Anisotropien wird die Falschfarbenskala „Spectrum“ verwendet (Abbildung 30,  $r$ ). Bei der Überlagerung von Intensitätsdaten mit Fluoreszenzlebensdauer-Werten (vergleiche Abbildung 37 und Abbildung 38) oder auch Anisotropie-Daten wird der HSL-Farbraum genutzt.[143] Die Intensitätsdaten geben die Helligkeit und damit die Ortsinformationen im kombinierten Bild vor, der darzustellende Parameter den Farbton und, abhängig von der Farbskala, die Sättigung.

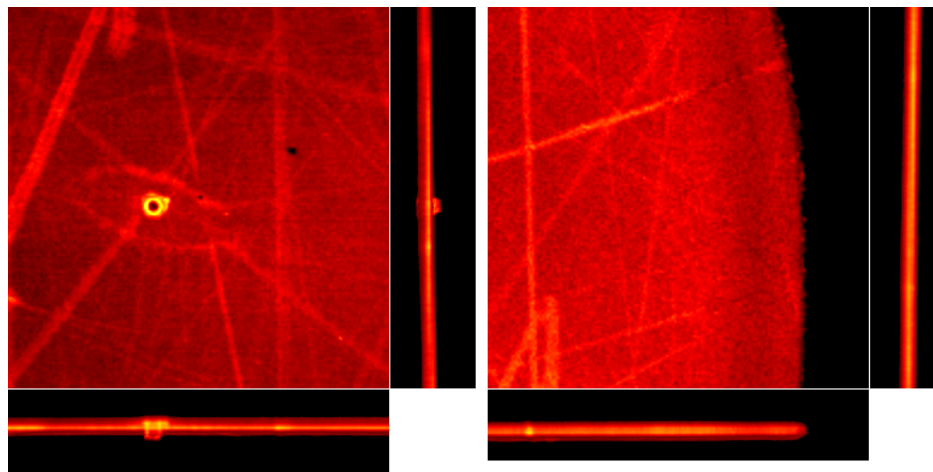
#### 4.1.1 BOPP-Folien

Polypropylen weist aufgrund eines hohen Kristallisationsgrades sehr gute mechanische Eigenschaften auf.[144] Wenn extrudierte Polypropylenfolien in beide Richtung verstreckt werden, so entsteht eine transparente Folie mit sehr hoher Festigkeit, BOPP genannt (biaxial orientiertes Polypropylen). Daher eignet sich BOPP hervorragend als Substrat zur ortsselektiven Plasmabehandlung. Im Rahmen des Projekts „Microstructured Surface Treatment by Atmospheric-Pressure Microplasmas“ wurden BOPP Folien im DBD-Plasma mit PDMS-Stempeln mit geschlossenen Kavitäten behandelt. Mit diesem Aufbau wurden geringere Aminogruppendichten als durch die porösen Metallelektroden erzeugt, die zwar ausreichend für andere Analysemethoden und Anwendungen sind, jedoch die Fluoreszenzanalyse erschwerten. Mit den porösen Metallelektroden des P<sup>3</sup>M-Projekts können durch den kontinuierlichen Gasfluss und längere Behandlungszeiten hohe Aminogruppendichten reproduzierbar erzeugt werden, so dass in dieser Arbeit nur mit dieser Methode plasmabehandelte Folien gezeigt werden. Wenn die Faserstärken der porösen Metallelektrode deutlich kleiner als der Durchmesser der Spots sind, so ergibt sich eine gleichmäßige Behandlung innerhalb des Spots. Abbildung 31 zeigt mit Fluorescamin gelabelte Aminogruppen unter einem Biochip-Reader (Biodetect BCR 202, Fraunhofer IPM, Auflösung 60 µm), der sich am Fraunhofer IST befindet. Dieser bildet die Fluoreszenz in Weitfeldanregung auf eine CDD-Kamera ab, wobei Anregung und Emissionsdetektion durch Filter wellenlängenselektiv erfolgt. Es zeigt sich, dass auf dieser Auflösungsskala die Spots an sich uniform behandelt sind und über der Fläche insgesamt homogen sind, obwohl die optische Emission der Plasmaentladung in Abbildung 22 deutlich sichtbare intensivere Bereiche im Zentrum und am Rand aufweist. Dies ist vor allem dadurch zu erklären, dass die metastabilen Spezies N(<sup>4</sup>S) und N<sub>2</sub>(A) im Plasma eine wesentliche Rolle bei der Aminierung der Oberfläche spielen und durch ihre Langlebigkeit homogen über die Substratfläche einer Kavität verteilt sind.[145]



**Abbildung 31:** Fluoreszenz von mit Fluorescamin gelabelten primären Aminogruppen mit einem Biochip-Reader aufgenommen. Anregungswellenlängen 380-410 nm, Detektionsbereich 440-480 nm (Quelle: Hinze, IOT, TU Braunschweig).

Mit der Zweiphotonenmikroskopie können einzelne Spots mit deutlich höherer Auflösung betrachtet und dabei auch ein Tiefenprofil aufgenommen werden, um die dreidimensionale Verteilung der Aminogruppen zu untersuchen. Dabei werden 2D-Bilder in unterschiedlichen Tiefen der Probe aufgenommen (siehe zum Beispiel Abbildung 40) und aus den Einzelbildern ein 3D-Bild mit Hilfe des ImageJ-Plugins Volume Viewer 1.31 im Modus Volume I/II generiert.[146] Dabei werden die zweidimensionalen Pixel in einem Stapel (*stack*) von Bildern zu Voxeln\* transferiert und ermöglichen so die Bilddarstellung aus jeder beliebigen Perspektive.



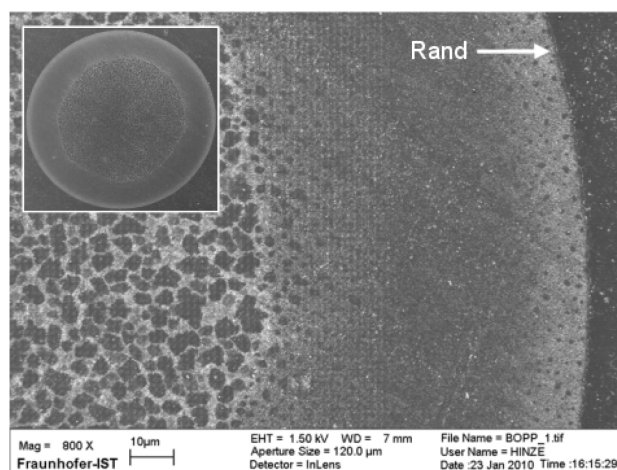
**Abbildung 32:** Gerenderte 3D-Bilder eines mittels einer Gewebeelektrode erzeugten 500 µm Aminogruppen-Spots durch 30 s Plasmabehandlung auf BOPP in Aufsicht und zwei Seitenansichten als Projektion in die Ebene. Die Größe der gescannten Bereiche entspricht  $80 \times 80 \times 19 \mu\text{m}^3$  links respektive  $80 \times 80 \times 13 \mu\text{m}^3$  rechts. Die Intensitätswerte zwischen den beiden Bildern sind nicht direkt miteinander vergleichbar. Die Aufsicht ist kein Einzelbild, also kein optischer Schnitt, sondern stellt die integrale 3D-Intensität auf der Oberfläche dar.

Durch die hohe Auflösung des Mikroskops werden mehr Details als mit dem Biochip-Reader sichtbar. Der Rand der Behandlung ist sehr scharf. Dies zeigt, dass durch die Verwendung von PDMS die Kavität gut abgeschlossen wird und die Plasmabehandlung so klar definiert ist. Die Behandlung ist relativ gleichmäßig am Rand sowie in der Mitte des Spots, ganz im Gegenteil zu dem REM-Bild eines Spots (Abbildung 33). Dort sind deutlich inselartige Veränderungen der Oberflächentopographie durch die Plasmabehandlung im Zentrum des Spots zu erkennen sowie ein gepunkteter hellerer Rand. Diese Merkmale finden sich bei der Aminogruppenverteilung nicht wieder. Dies ist dadurch zu erklären, dass durch die Plasmabehandlung die Oberfläche angegriffen, man sagt auch geätzt wird, und die langen Polymerketten in kürzere Fragmente aufgespalten werden (*low molecular weight organic material*, LMWOM). Das LMWOM entsteht vorrangig im Zentrum des Spots, wo die Entladungsströme am höchsten sind (vergleiche Intensität der optischen Emission in

---

\* Voxel ist aus den Wörtern *volumetric* und Pixel zusammengesetzt und bedeutet volumetrisches Bildelement.

Abbildung 22 rechts). Die kurzen Ketten besitzen eine niedrigere Schmelztemperatur und können auch durch leichte Erwärmung im Plasma bereits auf der Oberfläche schmelzen und beim anschließenden Abkühlen zu kleinen Inseln aggregieren. Dieses LMWOM wird durch organisches Lösungsmittel, wie es bei der Fluoreszenzmarkierung verwendet wird, von der Oberfläche abgelöst.[147,148] Deswegen sind bei der anschließenden Fluoreszenzuntersuchung die Inseln nicht mehr zu finden. Es werden daher nur Amine detektiert, die kovalent an das intakte Polymer gebunden sind. Dies ist insofern kein Nachteil, als dass in der antizipierten Verwendung der plasma-aminieren Polymere für Bioassays auf Microarrays die Oberfläche in Kontakt mit unterschiedlichen Lösungsmittel kommt.[29] An den äußeren 10-15  $\mu\text{m}$  sind in Abbildung 33 auch leichte morphologische Veränderungen zu beobachten. Auch hier befindet sich ein Bereich starker Entladung, wodurch das Polymer an seiner Oberfläche geätzt wird. Außerdem können sich hier auch Ablagerungen aus dem PDMS befinden. Dieser Bereich ist im Fluoreszenzbild in Abbildung 32 rechts mit etwas geringerer Intensität wiederzufinden.

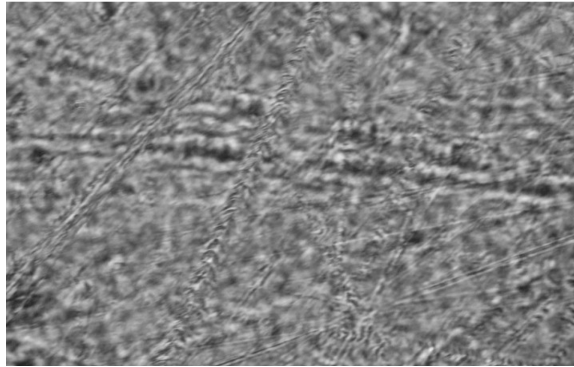


**Abbildung 33:** REM-Bild eines plasmabehandelten Spots. Links oben ist der gesamte Spot zu sehen, das große Bild ist ein vergrößerter Ausschnitt. Das Bild wurde mit einem SE2-Detektor aufgenommen, der sowohl Sekundärelektronen, als auch rückgestreute Elektronen detektiert. Da bei der Plasmabehandlung dieser Probe nur ein Metallvlies mit Faserstrukturen von 10-200  $\mu\text{m}$  zur Verfügung stand, wurde die Plasmaentladung durch ein 25  $\mu\text{m}$  Metallgewebe homogenisiert, dessen Muster auf dem Bild zu erkennen ist (Quelle: Hinze, IOT, TU Braunschweig).

Auffällig sind die schmalen Streifen mit etwas höherer Aminogruppendichte. Hierfür kann es mehrere Gründe geben. Die poröse Elektrode besteht aus einem Metallvlies mit 25  $\mu\text{m}$  dicken Fasern. Durch die damit verbundenen Inhomogenitäten können an einzelnen Fasern lokal hohe elektrische Feldstärken entstehen, so dass im Plasma dort eine höhere Konzentration an reaktiven Spezies erzeugt wird und damit eine stärkere Funktionalisierung der Oberfläche. Allerdings sind die verwendeten Fasern im Mittel 25  $\mu\text{m}$  groß, die zu erkennenden Strukturen aber nur einige wenige Mikrometer. Stattdessen zeichnet sich hier eher die Morphologie der Probe ab, so wie sie im Durchlichtbild in Abbildung 34 sichtbar



wird. Polypropylen besteht aus amorphen und kristallinen Kompartimenten und ist daher kein homogenes Substrat wie es ein Einkristall wäre.[144] In kristallinen Domänen ordnen sich die Polymerketten lamellenförmig, in amorphen Domänen hingegen eher statistisch an. Die im Durchlicht erkennbaren Streifen scheinen ein wenig stärker funktionalisiert zu werden, wahrscheinlich aufgrund unterschiedlicher Morphologie. Eine weitere Möglichkeit ist, dass hier Kratzer aus dem Herstellungsprozess für BOPP sichtbar werden wie von Nie *et al.* beschrieben.[149]



**Abbildung 34:** Durchlichtbild einer BOPP-Folie mit Fokus auf die Oberfläche, aufgenommen mit einer Kompakt-Digitalkamera durch das Mikroskopokular. Die Gesamtvergrößerung von Objektiv und Okular beträgt 400; der Abbildungsmaßstab der Kamera wurde leider nicht bestimmt.

Desweiteren ist in Abbildung 32 links ein heller Bereich im Zentrum des Bildes zu finden. Dies ist das Resultat einer im DBD-Prozess lokal starken filamentären Entladung. Durch lokale Feldstärkespitzen wird bei einer DBD-Entladung an dieser Stelle vermutlich ein hoher Entladestrom vorherrschen, der das Substrat lokal stark erhitzt, in diesem Fall wohl sogar aufschmilzt. In der dreidimensionalen Analyse lässt sich der Bereich auf der Probe auch in der Tiefe untersuchen. Die Einkerbung ist circa 7  $\mu\text{m}$  tief. Dies ist bei einer Substratdicke von 75  $\mu\text{m}$  unproblematisch, solange das Substrat von der filamentären Entladung nicht komplett durchdrungen wird und dadurch Mikrokanäle im Substrat entstehen, was sich nachteilig auf spätere Anwendungen auswirken könnte. Solche lokalen Inhomogenitäten der Entladung wurden verstärkt bei porösen Substraten beobachtet (PP-Membrane, Kapitel 4.1.5), wo sie auch tiefer in das Substrat eindringen können. Die dreidimensionale Fluoreszenzanalyse eignet sich außerdem zur Untersuchung der Behandlungstiefe. Bei längerer Behandlungsdauer der BOPP-Folien im Plasma ergibt sich erwartungsgemäß auch eine höhere Aminogruppendichte. Dabei stellt sich die Frage, ob die Länge der Behandlungsdauer auch einen Einfluss auf die Behandlungstiefe besitzt. Um dies zu untersuchen, werden die Intensitäts-Tiefenprofile quantitativ analysiert. Dabei ergibt das Tiefenprofil einer Messung eine Form, die sich am besten an eine Lorentz-Kurve anpassen lässt. In Voruntersuchungen ist die Auflösungsbestimmung an Mikrokügelchen (*microbeads*) kleiner als die Auflösungsgrenze des Mikro-

skops durch Funktionsanpassung an eine Lorentz-Kurve erfolgt. Das gemessene Tiefenprofil der BOPP-Folie ist daher die Faltung der PSF in axialer Dimension  $z$  mit dem eigentlichen Profil (Gleichung (4-1)).

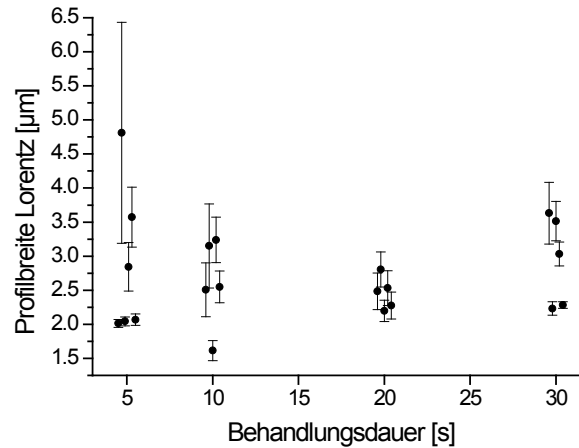
$$L(z, w_{PSF}) \otimes f(z) = L(z, w_{resp}) \quad (4-1)$$

Im Fourier-Raum sind Lorentz-Kurven exponentielle Abklingkurven und aus einer Faltung wird eine Multiplikation. Daher muss zumindest mathematisch das wahre Profil der Behandlung auch eine Lorentz-Kurve sein (Gleichung (4-2)). In diesem Fall ist die wahre Breite der Behandlung die ermittelte Breite des gemessenen Tiefenprofils minus der Breite der PSF.

$$\mathfrak{F}[f(z)] = e^{-t\left(\frac{1}{\tau_{resp}} - \frac{1}{\tau_{PSF}}\right)} \quad (4-2)$$

$$\mathfrak{F}^{-1}[\mathfrak{F}[f(z)]] = L(z, w_{sig}) \text{ mit } w_{sig} = w_{resp} - w_{PSF} \quad (4-3)$$

Die Ergebnisse mehrerer Einzelmessungen für verschiedene Spots und unterschiedliche Stellen im Spot sind in Abbildung 35 zusammengefasst. Die Fehlerbalken geben dabei die Unsicherheit bei der Bestimmung der Breite  $w$  der Lorentz-Kurve an.



**Abbildung 35:** Abhängigkeit der Lorentz-Profilbreiten von der Plasmabehandlungsdauer.

Einzelne Datenpunkte besitzen eine große Abweichung von anderen Datenpunkten sowie eine große Bestimmungsunsicherheit; andere dagegen liegen sehr nah beieinander. Dies ist dadurch zu erklären, dass das Tiefenprofil stark von einem idealen Lorentz-Profil abweicht, zum Beispiel durch eine Schulter. Allerdings haben auch diese Messungen ihre Gültigkeit; sie zeigen die Heterogenität der Probe so wie sie bei Polymeren zu erwarten ist. Aus den einzelnen Werten wird für jede Behandlungsdauer ein gewichteter Mittelwert gebildet. Diese sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

**Tabelle 2:** Gewichtete Mittelwerte der Profilbreiten für unterschiedliche Behandlungsdauern von BOPP-Folien mit porösen Metallelektroden. Der Wert  $N$  gibt dabei die Anzahl der Einzelmessungen an. Zum Vergleich sind die mittleren Intensitäten von primären Aminen aus je 10 Spots gemessen am Biochip-Reader angegeben.

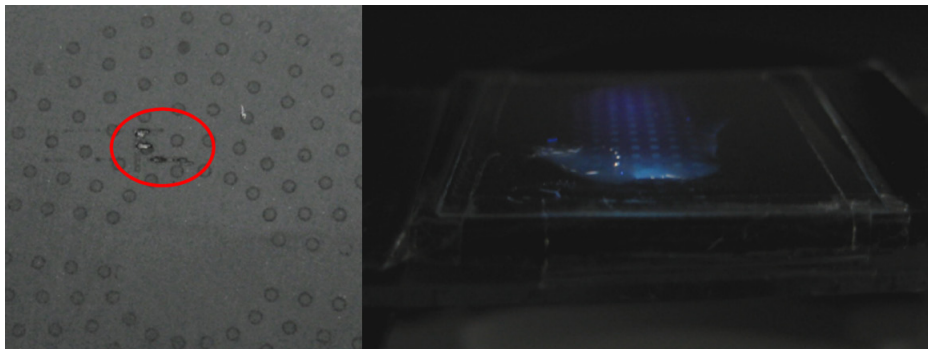
$t$	$w$	$\pm$	$N$	$\langle I \rangle$	$\pm$
s	$\mu\text{m}$			a.u.	
5	2.06	0.21	6	540	70
10	2.12	0.77	5	980	70
20	2.38	0.24	5	2480	610
30	2.35	0.42	5	2340	540

Ein Nullhypothesentest zwischen allen Wertepaaren ergibt, dass nur die Mittelwerte für 5 s und 20 s mit 95%iger Sicherheit unterscheidbar sind, dies jedoch auch nur knapp. Auch wenn ein leichter Trend erkennbar ist, so ist dieser statistisch nicht signifikant. Von den angegebenen Werten ist noch nicht die Breite der PSF abgezogen. Diese wird anhand von fluoreszierenden Mikrokügelchen mit 100 nm Durchmesser eingebettet in Agarosegel bestimmt. Als minimal gemessener Wert ergeben sich circa 800 nm. Die axiale Auflösung ist empfindlich gegenüber mehreren optischen Faktoren, unter anderem nach Sheppard und Matthews auch vom Brechungsindex der Probe (siehe Gleichung (2-20)) und variiert daher merklich.[66,150] Hierzu wurden jedoch keine genaueren Untersuchungen durchgeführt. Ideal wäre ein mikroskopisch glattes Substrat gleichen Brechungsindex mit einer Monolage an fluoreszierenden Molekülen, um einen zuverlässigen Wert für die axiale Auflösung zu erhalten. Daher wird für die BOPP-Messungen eine axiale Auflösung von 1  $\mu\text{m}$  angenommen. Die tatsächliche Profilbreite beträgt demnach für alle Behandlungsdauern gut 1  $\mu\text{m}$ . Dieser Wert bedeutet aber nicht, dass sich eine 1  $\mu\text{m}$  dicke Aminogruppenschicht auf der Folienoberfläche befindet. Die zur Bildung der Aminogruppen beteiligten Spezies besitzen Eindringtiefen in PP von wenigen Nanometern bis circa 10 nm.[31,151] Vielmehr spiegelt der Wert die Rauigkeit der Probe wieder; Polypropylen besitzt auf einer Nanometerskala eine schwamm- bis filzartige Morphologie.[148,149,152,153] Ein Blick auf die Intensitätswerte in Tabelle 2 zeigt, dass die Aminogruppendichte aber sehr deutlich ansteigt, für längere Behandlungsdauern aber wahrscheinlich einer Sättigung entgegenläuft. Eventuell steigt bei sehr langen Behandlungsdauern auch der Anteil von LMWOM überproportional an. Dazu muss aber einschränkend erwähnt werden, dass das zur Fluoreszenzmarkierung verwendete Fluorescamin eine Rotverschiebung der Emission bei hohen Aminogruppendichten zeigt.[95] Wenn dadurch ein höherer Anteil der Fluoreszenz außerhalb des Detektionsfensters gelangt, so werden dadurch bei hohen Dichten zu niedrige Werte gemessen. Abhilfe würde ein breitbandigerer Fluoreszenzfilter schaffen, wodurch im Gegenzug aber die Selektivität erniedrigt würde.

Abschließend lässt sich die Aussage treffen, dass durch die längere Behandlungsdauer die Aminogruppendichte in den Spots erhöht wird, nicht jedoch die Rauigkeit der Probe, was auf einen nachhaltigen Angriff der Substratoberfläche durch das Plasma zurückzuführen wäre.

#### 4.1.2 PP/C-Komposite

Die Zweiphotonenanregung eignet sich nur für im Nahinfrarotbereich transparente Substrate. PP/C-Komposite enthalten einen großen Anteil Graphit. Dadurch sind sie leitfähig und eignen sich als Substrate für MALDI-TOF-Experimente, um ortsselektiv Biomoleküle massenspektrometrisch untersuchen zu können.[29] Dadurch absorbieren sie aber sehr stark sichtbare und infrarote Strahlung, damit auch den Laserstrahl. Bei einer angenommenen Fläche des fokussierten Laserstrahls von  $0.1 \mu\text{m}^2$  und einer Leistung von 1 mW ergibt sich eine Bestrahlungsstärke von  $1 \text{ MW}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Die Probe wird lokal stark erhitzt und zerstört (Abbildung 36 links). Alternativ lassen sich die Komposite mit Einphotonen-Weitfeldanregung (siehe Abbildung 9) untersuchen. Anstelle von 800 nm wird frequenzverdoppeltes Licht mit 400 nm Wellenlänge verwendet. Durch die gepulste Anregung wird weiterhin eine zeitaufgelöste Messung gewährleistet. Allerdings geht die Tiefenauflösung verloren, was aber bedingt durch das schwarze Substrat keinen Verlust der Tiefenschärfe darstellt und bei vermuteten Behandlungstiefen von nur wenigen Nanometern keinen Informationsverlust mit sich bringt.

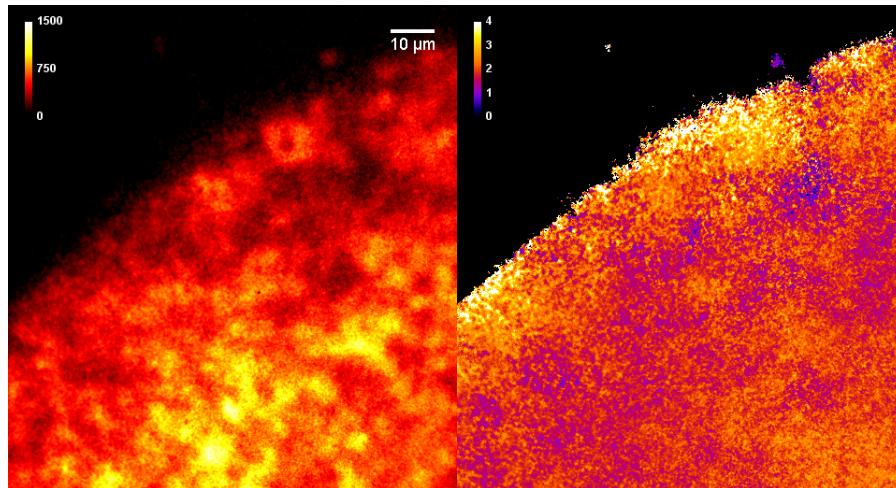


**Abbildung 36:** Foto einer plasmabehandelten PP/C Oberfläche nach Fokussierung des Infrarot-Laserstrahls auf die Probe (links). Foto der Fluoreszenz durch Einphotonen-Weitfeldanregung (rechts).

Die Plasmabehandlung auf den Kompositen erzeugt eine sehr hohe Aminogruppendichte. Die Fluoreszenz ist bereits mit bloßem Auge sichtbar, vor allem durch den hohen Kontrast des schwarzen Substrats. Die zeitaufgelöste Messung bietet den großen Vorteil, dass durch sie die Intensitäten direkt relativen Konzentrationen zugeordnet werden können, da die Anfangsintensität  $I_0$  proportional zur Konzentration  $c$  ist. In Abbildung 37 ist im Fluoreszenzlebensdauerbild zu erkennen, dass der Farbstoff keine einheitliche Lebensdauer auf der Kompositoberfläche besitzt. Die integrale, also nicht zeitaufgelöste Intensität ergibt sich zu:

$$I = \int_0^{\infty} I_0 \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} dt = I_0 \cdot \tau . \quad (4-4)$$

Bei Unterschieden in der Lebensdauer von zum Beispiel Faktor drei wie in der Probe gemessen ergeben sich somit auch um Faktor drei falsche relative Konzentrationen.

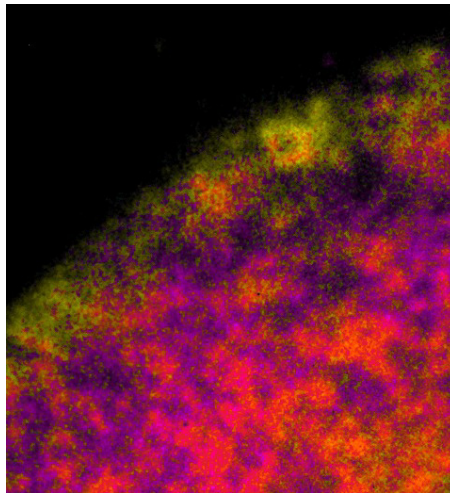


**Abbildung 37:** Rand einer plasmabehandelten Fläche eines PP/C-Komposits, fluoreszenzmarkiert mit Fluorescamin, aufgenommen mit einem 200 ps Gate (links) und 530±20 nm Fluoreszenzfilter. Rechts das zugehörige Fluoreszenzlebensdauerbild (Farbskala in Nanosekunden, monoexponentieller Fit).

Den maximalen Informationsgehalt erhält man aus einer Überlagerung des Lebensdauerbildes mit dem Fluoreszenzintensitätsbild (Abbildung 38). Dann sind Bereiche mit hoher Intensität hell und Bereiche niedriger Intensität dunkel oder sogar ganz schwarz. Bei der Errechnung der Fluoreszenzlebensdauer gehen solche räumlichen Intensitätsinformationen verloren; außerdem ist oft ein Pixelbinning notwendig, welches die laterale räumliche Auflösung verringert.\* Bei transparenten Proben können auch Durchlichtbilder zur Überlagerung verwendet werden. Durch die Überlagerung zeigt sich in Abbildung 38, dass Bereiche gleicher Helligkeit unterschiedliche Lebensdauern besitzen. Wahrscheinlich ist das unterschiedlichen Mikroumgebungen auf der Oberfläche oder der Ausbildung von Fluorophoraggregaten zuzuschreiben.

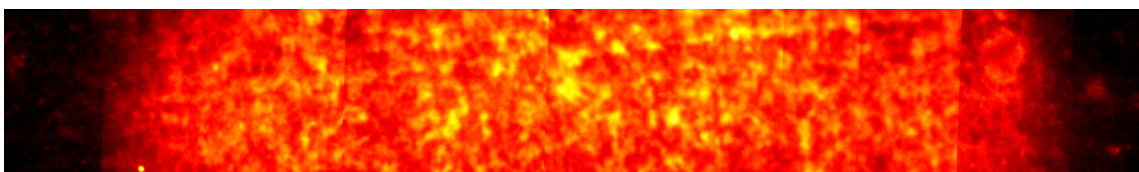
---

\* Im Lebensdauerbild in Abbildung 37 ist der Bereich oben links nur schwarz, weil ein Intensitätsgrenzwert (*threshold*) gesetzt wurde, unter dem keine Fluoreszenzlebensdauer errechnet wird. Ansonsten lässt sich für jedes Pixel eine Fluoreszenzlebensdauer errechnen.



**Abbildung 38:** Überlagerung des Lebensdauerbildes mit dem Fluoreszenzintensitätsbild aus Abbildung 37.

Bei der Untersuchung der ortsselektiven Plasmabehandlung ist es wünschenswert, einen ganzen Spot, der einen Durchmesser von bis zu 500  $\mu\text{m}$  besitzt, zu visualisieren. Dadurch kann auf einem Blick die Aminogruppendichte und -uniformität überprüft werden. Dies ist jedoch nicht mit einer Einzelaufnahme möglich, sondern nur durch Zusammenfügen mehrerer Einzelbilder. Selbst bei Verwendung von Objektiven mit geringer Vergrößerung (zum Beispiel 10 $\times$ ) werden mindestens vier Einzelaufnahmen benötigt. Wenn die Bilder einen gewissen Überlappungsbereich besitzen, so können diese mit dem ImageJ-Plugin MosaicJ automatisch zu einem Gesamtbild zusammengefügt werden.[154] Das Resultat einer solchen Bilderreihe ist in Abbildung 39 zu sehen. Dabei wird eine, abgesehen von den Heterogenitäten durch die Art des Substrats, relative gleichmäßige Behandlung sichtbar, die in ihrer Intensität zum Rand hin aber in einem Bereich von circa 50  $\mu\text{m}$  abnimmt.



**Abbildung 39:** Zusammengesetztes Bild eines PP/C Spots mit 500  $\mu\text{m}$  Durchmesser.

Die Einzelbilder wurden manuell aufgenommen, das heißt durch Verschieben der Probe auf dem Objektisch. Da die Genauigkeit der Verschiebung nur 0.1 mm beträgt und das Bild aber nur circa 100 $\times$ 140  $\mu\text{m}^2$  groß ist, ergeben sich dadurch experimentelle Schwierigkeiten. Abhilfe schaffen kann ein Kreuztisch mit höherer Genauigkeit oder die Verwendung von Objektiven mit geringerer Vergrößerung, welche sich dann aber nur für Einphotonen-Anregung eignen. Eine weitere experimentelle Schwierigkeit ergibt sich in der gleichmäßigen Ausleuchtung des gesamten Bildes bei der Einphotonen Weitfeldanregung. Das dies nicht

perfekt gelingt, ergeben sich bei Zusammenfügen der Bilder Intensitätssprünge, da in diesem speziellen Fall der linke Rand weniger stark ausgeleuchtet wird als der rechte Rand.

### 4.1.3 DBD-Aminierung von Fasern

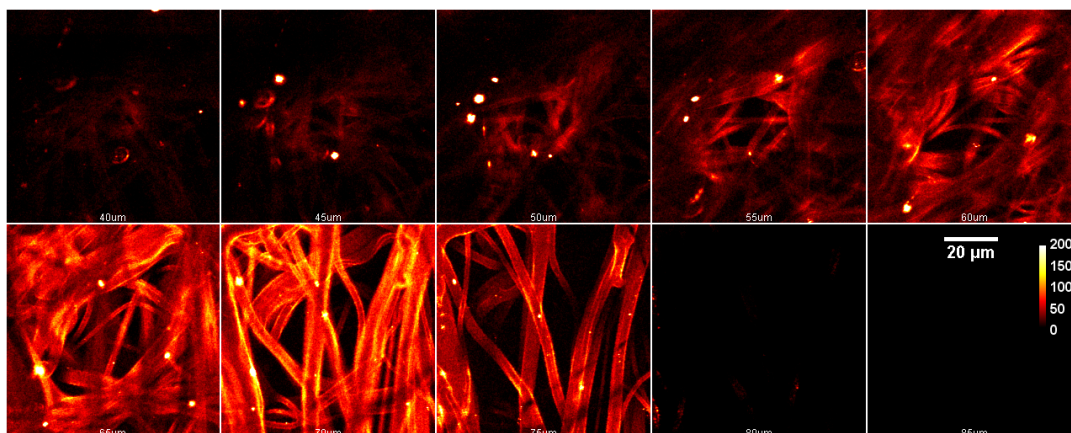
Die Aminierung von Polymeren kann nicht nur an kompakten Oberflächen durchgeführt werden, sondern auch an Substraten beliebiger Struktur wie Membranen oder Vliesen. Durch Plasmabehandlung kann die Oberfläche des Substrates chemisch verändert werden. Dadurch lassen sich Eigenschaften wie die Benetzbarkeit ändern oder nachgeschaltete Funktionalisierungen und damit Modifikationen der Oberfläche realisieren. So verringern zum Beispiel Fluorgruppen die Benetzbarkeit durch Erhöhung der Oberflächenenergie.[155] Damit wird das Produkt auch vor Einflüssen von Lösungsmitteln, Gerüchen oder auch Mikroorganismen geschützt. Eine Funktionalisierung mit Sauerstoff erhöht hingegen die Polarität und damit Benetzbarkeit von Polymeren durch Absenkung der Oberflächenenergie. Kritisch bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung solcher Proben ist die starke Streuung sowie der große Brechungsindexunterschied an der Oberfläche Polymer-Luft. Hierdurch verringern sich optische Auflösung und Signalstärke mit zunehmender Tiefe. Die Streuung kann durch Anwendung einer Immersion minimiert bis eliminiert werden. Hierbei wird die Probe mit einer Flüssigkeit mit möglichst gleichem Brechungsindex getränkt. Alle untersuchten Polymere haben einen Brechungsindex von 1.49 oder höher. Die Flüssigkeit sollte bei der Anregungswellenlänge keine Fluoreszenz zeigen, nicht mit dem Fluorophor oder dem Substrat reagieren beziehungsweise es lösen. Darüber hinaus vereinfacht ein niedriger Dampfdruck sowie eine geringe Toxizität den Umgang mit der Flüssigkeit. Für Polypropylen wird ein Brechungsindex  $n_D = 1.495$  angegeben.[156] In einer Immersion mit *p*-Xylol ( $n_D = 1.495$ , Angabe vom Hersteller Sigma-Aldrich) wird eine opake PP-Probe vollkommen transparent. Eine Immersion mit fluoreszenzarmen Immersionsöl für die Mikroskopie (Immersol™ 518 F,  $n_e = 1.518/n_D = 1.515$ , Carl Zeiss AG) erweist sich aber in den allermeisten Fällen als praktikabler; vor allem wegen des sehr niedrigen Dampfdrucks.

#### *PP-Vlies*

Polypropylen findet nicht nur breite Verwendung als Folien, sondern kann auch zu Fasern gesponnen werden.[144] Diese werden dann zu Vliesen oder Geweben weiterverarbeitet. Vliese kommen vielseitig als zum Beispiel Filter, Textilfutter oder Dämmmaterial zum Einsatz. Zu Testzwecken wurde ein PP-Vlies im DBD-Plasma mit Aminogruppen funktionalisiert und dreidimensional vermessen. Dabei zeigt sich, dass nicht nur die obersten Fasern funktionalisiert werden, sondern auch darunterliegende in einem geringeren Ausmaß. Dies

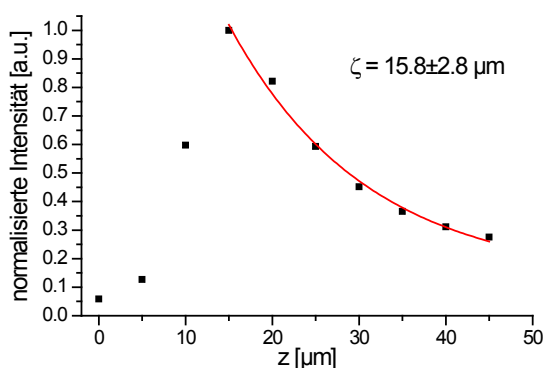


untermauert die These, dass an der Funktionalisierung der Polymeroberfläche vor allem metastabile Spezies wie das Stickstoffatom  $N(^4S)$  oder angeregter Triplettstickstoff  $N_2(A)$  beteiligt sind.[145]



**Abbildung 40:** Einzelbilder eines Tiefenscans eines plasma-aminieren PP-Vlieses mit Fluorescamin behandelt. Der Abstand zwischen den Bildern beträgt 5 µm. Die hellen Flecken sind höchstwahrscheinlich auf Luftblasen in der Immersion zurückzuführen.

Die Analyse des Intensitätstiefenprofils der in Abbildung 40 gezeigten Messung kann pixelweise, über einen ausgewählten Bereich oder über das ganze Bild erfolgen. Wählt man eine ausreichend große räumliche Mittelung (zum Beispiel  $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ ), so zeigt der Intensitätsverlauf nach Erreichen des Maximums einen exponentiellen Abfall (Abbildung 41). Somit kann durch Anlegen einer entsprechenden Funktion eine Behandlungstiefe  $\zeta$  definiert werden, die in dem Fall einer monoexponentiellen Fitfunktion dem  $1/e$ -Wert vom Maximalwert entspricht, und damit unterschiedliche Behandlungsarten beziehungsweise Proben miteinander verglichen werden. Solche Untersuchungen sind für Polypropylenmembrane erfolgt (Kapitel 4.1.5 und 4.1.7).

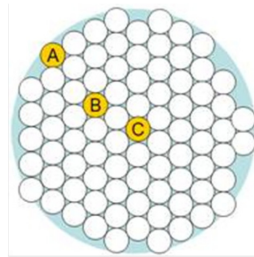


**Abbildung 41:** Tiefenintensitätsprofil des plasma-aminieren PP-Vlies aus Abbildung 40.



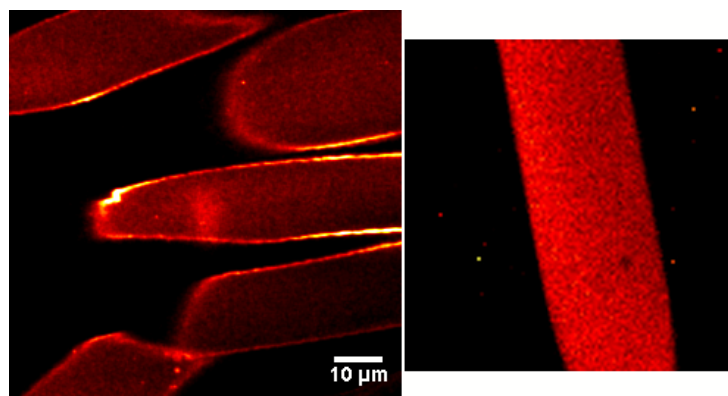
*PET-Fasern*

Polyethylenterephthalat ist ein vielverwendetes Polymer, das häufig als Textilfaser eingesetzt wird, da es sehr witterungsbeständig ist und kaum Wasser aufnimmt. Es besitzt einen mittleren Brechungsindex  $n_D = 1.600$ ; das Polymer ist stark doppelbrechend.[157] Optimale Immersionsflüssigkeiten sind zum Beispiel chlorierte Aromaten. Die untersuchten Proben bestehen aus circa 500  $\mu\text{m}$  dicken Fäden, die sich wiederum aus 160 Fasern mit circa 15  $\mu\text{m}$  Durchmesser zusammensetzen.[158]



**Abbildung 42:** Schematische Darstellung der Zusammensetzung der untersuchten PET-Fasern (Quelle: Baranski, Fraunhofer IST).

Interessant ist dabei die Frage, inwieweit die Funktionalisierung für eine einzelne Faser und in Abhängigkeit von der relativen Lage im Faden erfolgt. Bisherige Untersuchungen laufen vor allem über rasterlektronenmikroskopische Aufnahmen (REM) und Röntgen-Photoelektronenspektroskopie (XPS) sowie Rasterkraftmikroskopie (AFM).[159,160] Diese Techniken ermöglichen jedoch keine dreidimensional aufgelöste Analyse von chemischen Gruppen, was hingegen mit der Zweiphotonen-Fluoreszenzmikroskopie möglich ist. Die Fluoreszenzmarkierung der Amine erfolgt mit NBD-F, die Anregung bei 800 nm, die Fluoreszenz wird bei  $530 \pm 20$  nm detektiert.

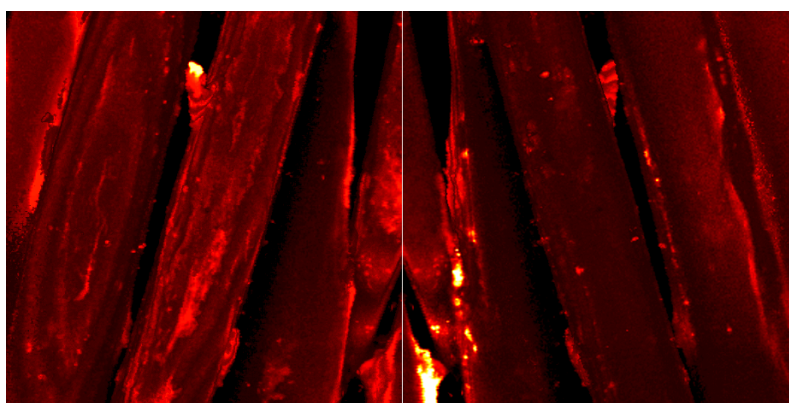


**Abbildung 43:** Querschnitt durch eine plasmabehandelte PET-Faser (links) und eine unbehandelte Faser (rechts), beide Proben sind mit NBD-F gelabelt.

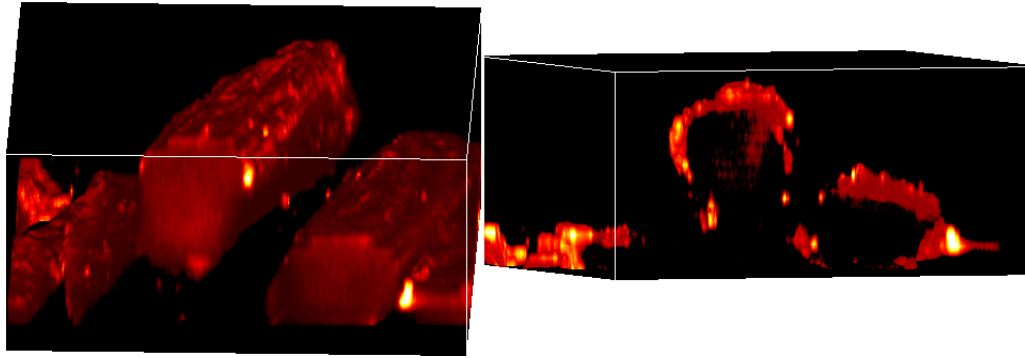
In Abbildung 43 links ist im Querschnitt der Fasern deutlich die Aminierung der Faseroberfläche zu erkennen. Es zeigt sich allerdings eine deutliche Eigenfluoreszenz des PET (rechts). Im Vergleich zur behandelten Probe zeigt sich, dass der helle Rand eindeutig

der Plasma-Aminierung zuzuschreiben ist. Die Absorptions- und Emissionsspektren von Ouchi *et al.* zeigen, dass Anregung im nahen UV-Bereich und Fluoreszenz im blauen Wellenlängenbereich erfolgt und dabei ein kleiner Teil auch den verwendeten Fluoreszenzfilter passiert.[161] Eine Diskriminierung der PET-Fluoreszenz von der Fluorescamin-Fluoreszenz durch unterschiedliche Fluoreszenzlebensdauer gelingt nicht. Abhilfe schaffen kann die Verwendung eines längerwellig emittierenden Farbstoffes wie zum Beispiel Sulforhodamin 101 oder auch eine längerwelligere Anregung, was aber zum Zeitpunkt der Messung nicht möglich war. Außerdem zeigt sich, dass die einzelnen Fasern nicht perfekt parallel zueinander liegen und technisch bedingt durch das Verschlingen der Filamente miteinander beim Weben auch Kurven und Knicke besitzen. Dazu erschwert auch der limitierte Messbereich von  $100 \times 100 \mu\text{m}^2$  lateral die Orientierung auf der Probe und die Auswahl repräsentativer Bereiche.

In der dreidimensionalen Analyse der Probe lässt sich gut die Oberfläche der runden Faser darstellen, die sonst in einem Einzelbild immer nur als optisches Schnittbild zu betrachten ist. Die Probe lässt sich so nicht nur von oben oder von der Seite betrachten, sondern auch von unten aus der Probe hinaus lassen sich die Fasern untersuchen. Es zeigt sich in einer exemplarischen Messung, dass die dem Plasma zugewandte Seite rauer ist und auch einen höheren Grad an Funktionalisierung aufweist, vergleiche Abbildung 44 und Abbildung 45. Dies steht in Einklang mit REM-Aufnahmen von Chen *et al.*[159] Somit scheint keine gleichmäßige Funktionalisierung der Fasern bei diesen Prozessparametern gewährleistet zu sein.

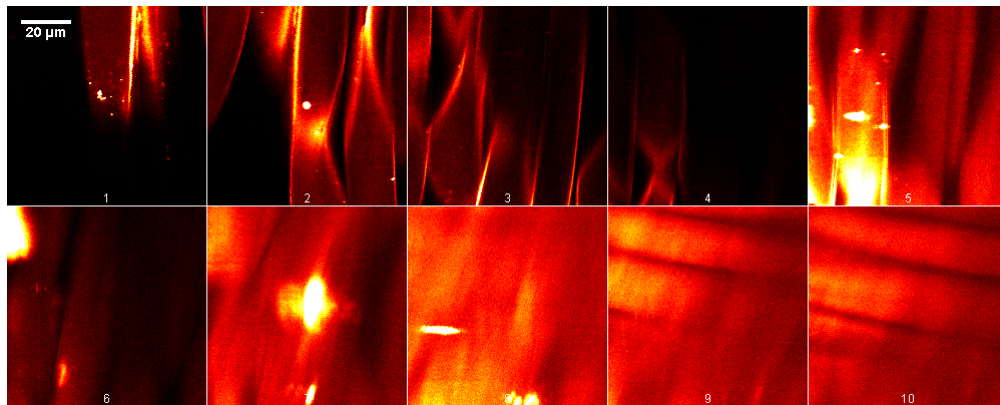


**Abbildung 44:** 3D-generiertes Bild von plasma-aminieren PET-Fasern in Aufsicht Perspektive von oben (links) und unten (rechts), Größe des Betrachtungsvolumens  $80 \times 80 \times 38 \mu\text{m}^3$ .



**Abbildung 45:** Gedrehte Ansicht des 3D-Bildes aus Abbildung 44, rechts mit höherem Intensitätsgrenzwert.

Wichtig ist allerdings nicht nur die Untersuchung einzelner Fasern, sondern des gesamten Fadens. Dafür muss eine Eindringtiefe in die Probe von 250  $\mu\text{m}$  erreicht werden, wenn der Faden von zwei Seiten aus vermessen wird. Das Ergebnis ist in Abbildung 46 dargestellt.



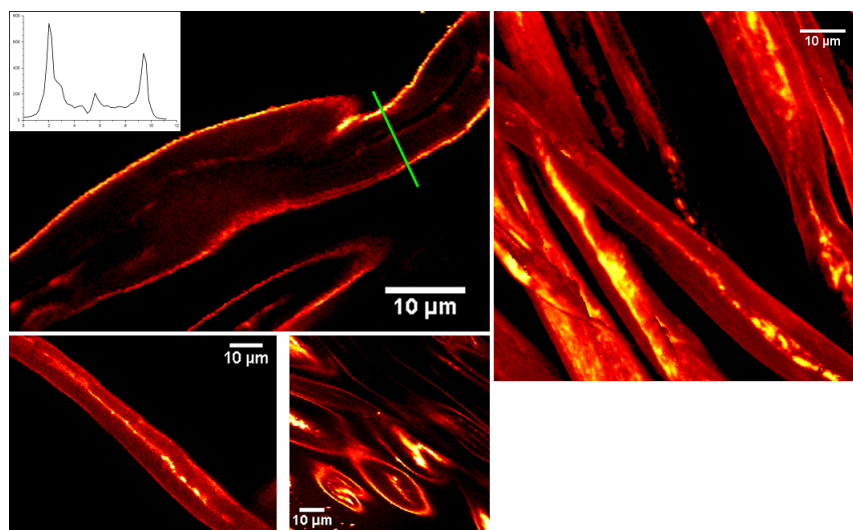
**Abbildung 46:** Tiefenscan einer plasma-aminiierten PET-Probe. Tiefe der aufgenommenen Bilder unterhalb des Deckgläschenrands: 1 – 10  $\mu\text{m}$ , 2 – 30  $\mu\text{m}$ , 3 – 50  $\mu\text{m}$ , 4 – 70  $\mu\text{m}$ , 5 – 80  $\mu\text{m}$ , 6 – 100  $\mu\text{m}$ , 7 – 120  $\mu\text{m}$ , 8 – 140  $\mu\text{m}$ , 9 – 160  $\mu\text{m}$ , 10 – 180  $\mu\text{m}$ .

Es ist gut zu erkennen, wie mit zunehmender Tiefe das Bild durch Streuung an Schärfe verliert. Aber auch die Zweiphotonenabsorption der PET-Faser kann eine Rolle spielen. Mit zunehmender Tiefe wurde sukzessiv die Anregungsleistung des Lasers erhöht, um ausreichend hohe Intensitäten zu erhalten. Daher sind die Intensitätswerte der Einzelbilder nicht untereinander vergleichbar. Der Arbeitsabstand des Zeiss EC Plan-NEOFLUAR Objektivs, das ist der Abstand zwischen Deckgläschen und Objektiv, beträgt 210  $\mu\text{m}$ . Damit ist mit 180  $\mu\text{m}$  fast die maximal erreichbare Eindringtiefe für dieses Objektiv erreicht. Andere Ölobjektive mit hoher numerischer Apertur, wie sie für die Zweiphotonenmikroskopie nötig sind, haben einen ähnlich großen oder sogar kleineren Arbeitsabstand. Mit zunehmender Tiefe ist kein deutlich hellerer Bereich auf der Oberfläche der Fasern mehr erkennbar. Stattdessen ist hier die Autofluoreszenz des PET dominant. Entweder ist hier die Plasmabehandlung deutlich schwächer und es findet gar keine signifikante Behandlung mehr statt oder sie ist aufgrund der verringerten Abbildungsschärfe nicht mehr von der Autofluoreszenz zu

unterscheiden. Eine Markierung mit einem wie bereits diskutierten langerwelliger anregbaren und emittierenden Fluoreszenzfarbstoff könnte eine spürbare Verbesserung der Datenqualität ergeben.

### *Baumwollfasern*

Baumwolle besitzt als Naturprodukt und damit nachwachsender Rohstoff eine große Bedeutung. Industriell verarbeitet besteht sie fast ausschließlich aus Zellulose. Aufgrund seiner chemischen Struktur sollte das Substrat keine Eigenfluoreszenz im sichtbaren Bereich zeigen. Durch die Vielzahl von Hydroxygruppen im Polymer kann Zellulose sehr viel Wasser aufnehmen. Durch Modifizierung der Faseroberfläche könnte die Wasseraufnahme verringert werden. Nasschemisch werden Zellulosefasern großtechnisch zu Viskose oder Zelluloseacetat modifiziert.[162] Baumwolle besitzt einen mittleren Brechungsindex  $n_D = 1.547$ ; das Polymer ist leicht doppelbrechend.[157] Die Fluoreszenzmarkierung der Amine erfolgt mit NBD-F, die Anregung bei 800 oder 840 nm, die Fluoreszenz wird bei  $530 \pm 20$  nm detektiert.



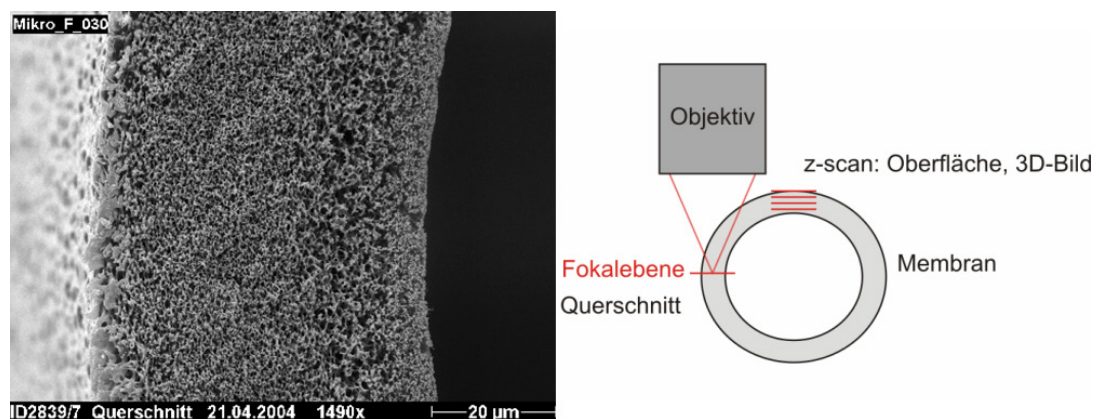
**Abbildung 47:** Querschnittsbilder von plasmabehandelten und fluoreszenzmarkierten Baumwollfasern und ein gerendertes 3D-Bild mehrerer Fasern (oben rechts,  $80 \times 80 \times 70 \mu\text{m}^3$ ). Im linken oberen Bild zeigt die grüne Linie die Stelle des gemessenen Intensitätsprofils im Graph oben links.

Bei der Betrachtung der Fasern unter dem Mikroskop wird deutlich, dass Zellulosefasern im Gegensatz zu PET-Fasern ein Naturprodukt sind. Sie sind rauer und ungleichmäßiger aufgebaut und besitzen unterschiedliche Durchmesser. Der typische Aufbau der Zellulosefasern aus primärer und sekundärer Wand sowie das Lumen sind erkennbar (in Abbildung 47 vor allem im unteren rechten Bild).[162] Deutlich zeichnet sich die Fluoreszenz der markierten Aminogruppen auf der Oberfläche der Fasern ab. Im in Abbildung 47 exemplarisch gezeigten Intensitätsprofil sind auf der Oberfläche circa 800 Intensitätseinheiten zu messen; im Inneren der Faser sind es etwa 100. Die Eigenfluoreszenz der Fasern ist merklich schwächer als beim PET, aber dennoch nicht vernachlässigbar. Eventuell kann dieser störende

Faktor durch geeignete Reinigungsschritte minimiert werden. Auch für diese Faseruntersuchung könnte eine langwelligere Anregung und ein langwelliger emittierender Farbstoff ein besseres Kontrastverhältnis von Farbstofffluoreszenz zu Faser und eine höhere Eindringtiefe aufgrund geringerer Streuung erzielen.

#### 4.1.4 Hohlfasermembrane

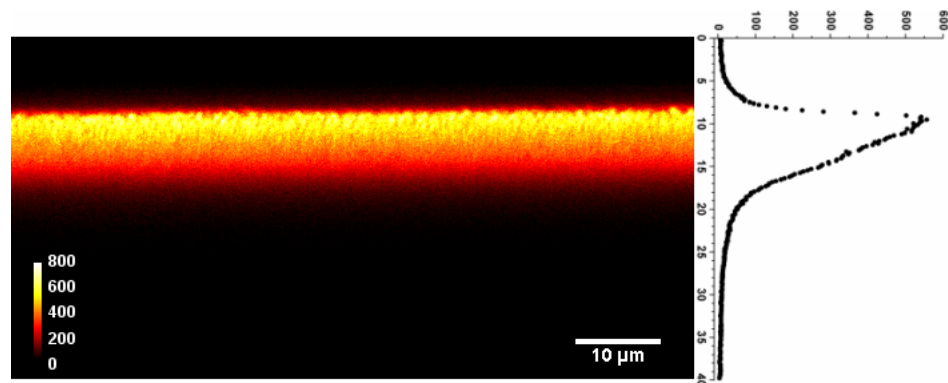
Durch spezielle Herstellungsverfahren lassen sich aus Polymeren poröse Substrate erzeugen. Dadurch lassen sich Membrane herstellen, die eine breite Anwendung als Filter zum Beispiel in der Lebensmittelindustrie, Pharmazie oder im Bereich der Medizin Anwendung finden. Im Nassspinnverfahren können Hohlfasermembrane unterschiedlicher Porenstruktur und Membrandimensionen hergestellt werden. Hohlfasermembrane der Firma Gambro Dialysatoren GmbH, Hechingen finden in der chronischen Nierenersatztherapie sowie bei akutem Versagen der Nieren und der Leber Anwendung. Im Rahmen von F&E-Aktivitäten werden Hohlfasermembrane aus den Komponenten Polyarylethersulfon (P(A)ES) und Polyvinylpyrrolidon (PVP) im  $\text{NH}_3$ -haltigen Niederdruckplasma durch Einführung von Aminogruppen chemisch modifiziert.[163] Die Funktionalisierung wird titrimetrisch beziehungsweise durch Röntgenphotoelektronenspektroskopie nachgewiesen und quantifiziert. Durch die plasma- und nasschemischen Prozessschritte sollen sogenannte funktionalisierte Membrane geschaffen werden, die neben dem bekannten Größenausschluss auch noch spezifische Adsorption ermöglichen sollen. Die Hohlfasern haben einen Durchmesser von circa  $320\text{ }\mu\text{m}$ , eine Wandstärke von circa  $50\text{ }\mu\text{m}$  und eine selektive Porengröße von etwa  $0.3\text{ }\mu\text{m}$ .[164] Aufgrund ihres Cut-Offs ist die Membran damit in der Lage, Blutzellen und Blutplasma voneinander zu trennen. Man spricht daher von auch einem Plasmafilter. Die Aminogruppen sind mit NBD-F beziehungsweise SR101 Säurechlorid gelabelt und mit  $840\text{ nm}$  angeregt worden. Die verwendeten Fluoreszenzfilter sind  $530\pm 20\text{ nm}$  für NBD-F und  $630\pm 46\text{ nm}$  für SR101.



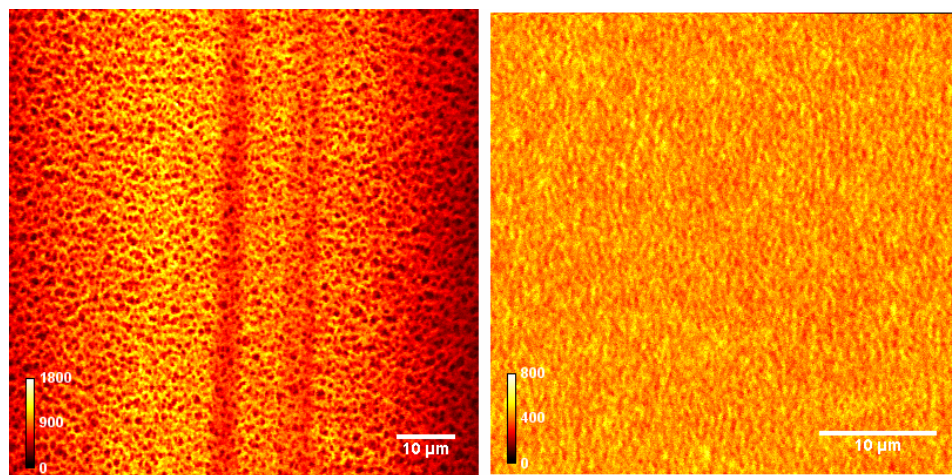
**Abbildung 48:** REM-Bild einer der untersuchten Membrane ähnlichen Hohlfasermembran (links, Quelle: Firma Gambro, Hechingen) und Veranschaulichung der Untersuchungsmöglichkeiten mit der Zweiphotonenmikroskopie (rechts).

Die Hohlfasermembran besitzt die Form eines Hohlzylinders. Durch das Prinzip der optischen Sektionierung kann entweder ein Querschnittbild aufgenommen werden, wenn die Fokalebene wie in Abbildung 48 rechts gezeigt die Probe seitlich durchschneidet, oder ein Oberflächenbild. Durch einen 3D-Tiefenscan kann jedoch auch ein Tiefenprofil der Plasma-behandlung aufgenommen werden, allerdings nur mit der geringeren axialen Auflösung. Beide Optionen sind in Abbildung 49 und Abbildung 50 zu sehen. An das Tiefenprofil lässt sich keine Exponentialfunktion anpassen, wie es bei den PP-Membranen der Fall ist (Kapitel 4.1.5 und 4.1.7). Um einen Zahlenwert für eine Eindringtiefe der Plasmabehandlung in das Substrat zu erhalten, muss man einen Intensitätswert definieren, der einem gewissen Prozentsatz der Spitzenintensität entspricht. In diesem Fall liegt der 50%-Wert bei 5.3  $\mu\text{m}$  und der  $1/e$ -Wert (36.8%) bei 6.4  $\mu\text{m}$ . Hierbei muss aber die Debatte über das Eindringvermögen der Farbstoffe geführt werden. Die die Aminogruppen erzeugenden Spezies im Plasma sind Stickstoffatome, angeregter Distickstoff wie auch  $\text{NH}_x$ -Radikale. Sie sind deutlich kleiner als die Farbstoffe zur Fluoreszenzmarkierung und können dadurch tiefer in das Substrat eindringen. Daher besteht die Möglichkeit, dass nicht alle Aminogruppen der Probe für eine Fluoreszenzmarkierung durch die Farbstoffmoleküle erreichbar sind. Die Porengröße der Membran mit circa 300 nm stellt nicht den limitierenden Faktor dar, sondern eher Mikroporositäten in der Größenordnung von einigen Nanometern. Bei kompakten Oberflächen wie Folien oder Fasern, wo die Behandlungstiefe unterhalb der Auflösungsgrenze des Mikroskops liegt, würde sich der Effekt vor allem bei einer Quantifizierung bemerkbar machen und könnte geringere Werte als mit anderen Verfahren liefern. Bei porösen Proben mit Behandlungstiefen von mehreren Mikrometern kann dies jedoch auch einen Einfluss auf die Messung des Tiefenprofils haben, also wenn Aminogruppen in größerer Tiefe weniger gut vom Fluoreszenzfarbstoff erreichbar sind als solche direkt auf der Oberfläche. Allerdings sind je nach Verwendung des plasma-aminieren Substrats die Moleküle, die mit den Aminogruppen in einer späteren Anwendung reagieren beziehungsweise interagieren, auch deutlich größer als die Spezies im Plasma, so dass durch die Fluoreszenzmarkierung letztendlich die für eine Reaktion verfügbaren Aminogruppen detektiert werden. Sollte dies ein entscheidender Aspekt sein, so sollten, falls möglich, zur Fluoreszenzmarkierung Moleküle mit vergleichbarer Größe und ähnlichen funktionellen Gruppen gewählt werden, um eine möglichst ähnliche Wechselwirkung mit der Polymeroberfläche zu erzielen.





**Abbildung 49:** Querschnitt der Aminogruppenverteilung einer Hohlfasermembran im Falschfarbenbild (links) und das zugehörige Intensitätsprofil gemittelt über 10 µm Breite (rechts).

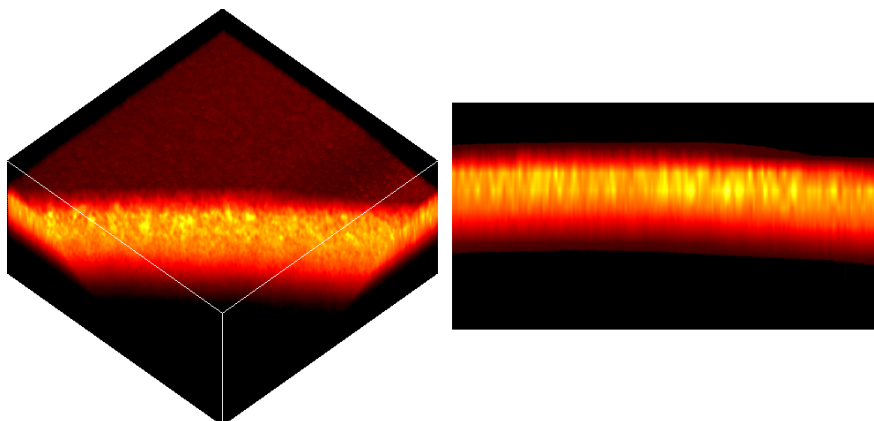


**Abbildung 50:** Aminogruppenverteilung auf der Oberfläche der Membran (links) und einige Mikrometer tiefer in der Membran (rechts). Die Bilder sind an unterschiedlichen Positionen mit unterschiedlicher Pixelauflösung aufgenommen und auch in ihrer Intensität nicht direkt miteinander vergleichbar.

Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Oberfläche liefert weitere Informationen zur Aminogruppenverteilung auf der Hohlfasermembran. In Abbildung 49 wird deutlich, dass das Maximum der Aminogruppendichte nicht direkt an der Oberfläche liegt. Zu erklären ist dies dadurch, dass auf der Oberfläche größere Poren mit höherem Hohlraumanteil liegen als weiter im Inneren der Membran (Abbildung 48 links und Abbildung 50 links). So befindet sich nach außen hin weniger Materie im Fokalkvolumen, die mit fluoreszenzmarkierten Aminogruppen besetzt sein kann. In einigen Mikrometern Tiefe ist die Aminogruppenverteilung deutlich homogener (Abbildung 50 rechts). Dies lässt sich ansatzweise auch im 3D-Bild (Abbildung 51 links) erkennen. In der Seitenansicht des Tiefenscans zeigt sich, dass das erhaltene Tiefenprofil aus der Querschnittaufnahme reproduziert werden kann.\* Damit ist eine Profilmessung aus einer Querschnittaufnahme äquivalent zu einer 3D-Tiefenmessung.

\* In der Seitenansicht erkennt man die leichte Krümmung der Probe. Diese fällt aber nicht so stark aus, wie man vom Durchmesser der Hohlfasermembran (300 µm) erwarten würde. Wahrscheinlich wird bei der Probenpräparation die Membran durch das Deckgläschen ein wenig flachgepresst.

Letztere ist deutlich zeit- und datenaufwendiger, enthält aber mehr Informationen und erlaubt simultan die Betrachtung der äußeren Oberfläche.

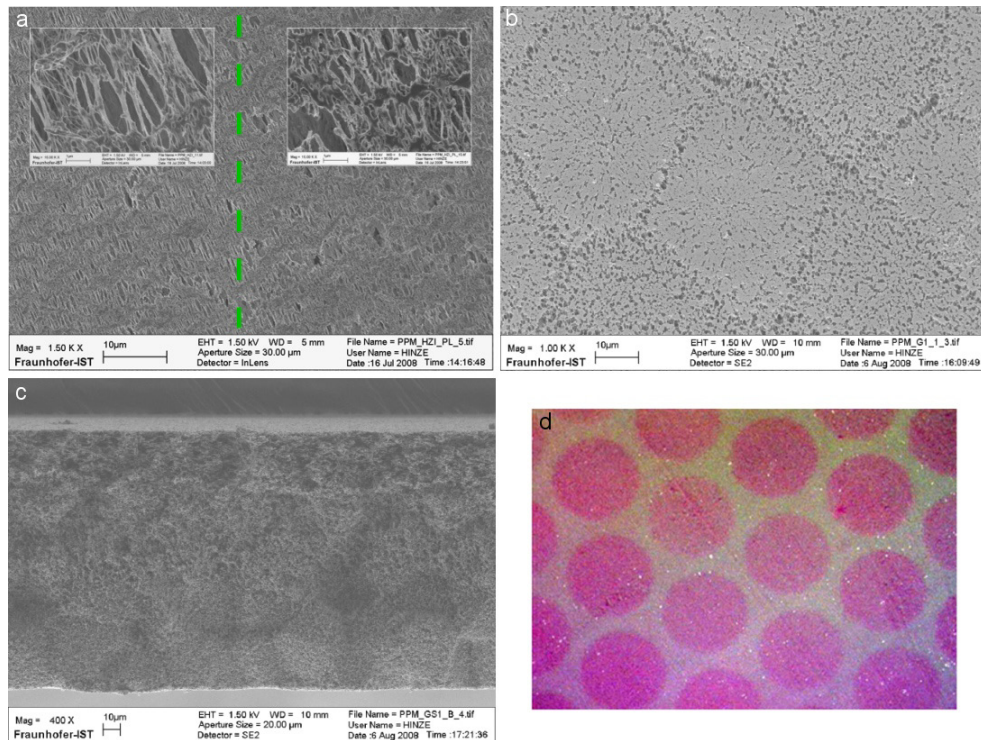


**Abbildung 51:** Gerendertes 3D-Bild eines  $50 \times 50 \times 30 \mu\text{m}^3$  Tiefenscans in angeschnittener Schrägaufsicht (links) und in Seitenansicht (rechts).

#### 4.1.5 Polypropylen-Membrane

Wie bereits kurz in Kapitel 4.1.4 erwähnt, finden sich für Polymermembrane vielfältige Anwendungsfelder. PP-Membrane können auch als Substrat zur ortsselektiven Plasma-behandlung benutzt werden. Dabei wirkt sich vor allem die hohe spezifische Oberfläche der Membran positiv auf die erzielbare Aminogruppendichte aus, als auch auf physikalische Eigenschaften wie zum Beispiel die Benetzbarkeit. Durch die Porosität besitzt die Membran einen niedrigeren elektrischen Widerstand als kompakte Polymersubstrate. Da das Substrat bei der Plasmabehandlung einen Teil der dielektrischen Barriere bildet (siehe Kapitel 3.5), wird der Entladestrom nicht ausreichend begrenzt. Als Folge dessen ergibt sich bei der Plasmabehandlung eine starke thermische Belastung, wodurch im Mittelpunkt der Spots, wo die höchsten Entladungsdichten beobachtet werden (siehe Abbildung 22 rechts), das Substrat aufgeschmolzen wird und ein mit dem bloßen Auge sichtbares Loch entsteht. Der Einsatz einer  $75 \mu\text{m}$  BOPP-Folie als zusätzliches Dielektrikum zwischen Substrat und geerdeter Elektrode verhindert diesen unerwünschten Effekt. Die Morphologie der PP-Membran wurde unter einem Rasterelektronenmikroskop untersucht und ist in Abbildung 52 wiedergegeben.

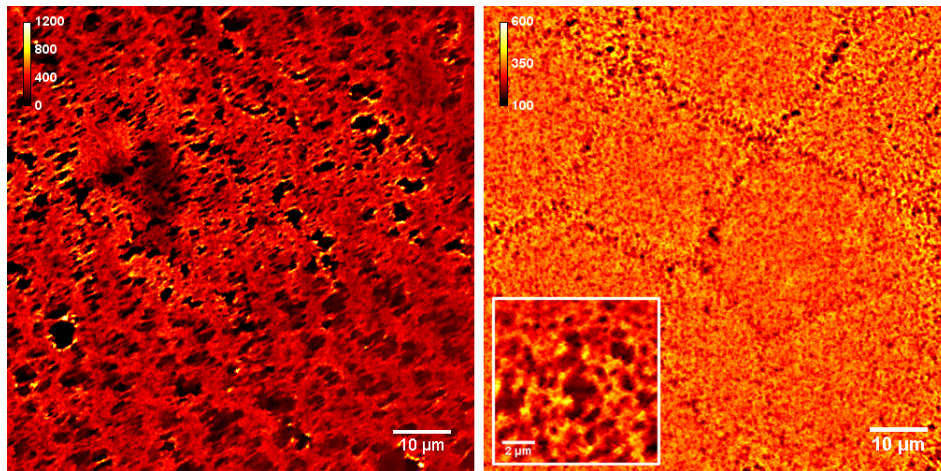




**Abbildung 52:** a – REM-Aufnahme der Membranoberseite, links der grün gestrichelten Linie ist ein unbehandelter Bereich zu sehen, rechts davon einer behandelter, b – REM-Aufnahme der Membranunterseite, c – REM-Aufnahme einer Bruchkante, d – Foto eines Anfärbungsexperiments mit Säurefuchsin (Quelle: Hinze, IOT TU Braunschweig).

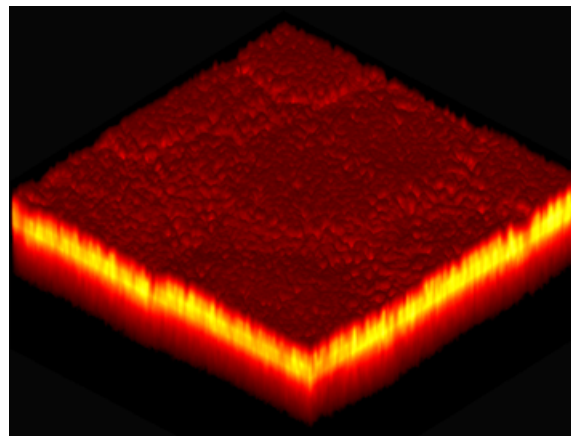
Dabei zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen der Membranoberseite und -unterseite. Während auf der Oberseite lange, schmale Poren dominieren, ist die Unterseite gleichmäßiger was die Porengröße betrifft und besitzt eine wabenförmige Struktur. Auf der Bruchkantenaufnahme zeigt sich, dass die Membran von oben nach unten graduell feinerporiger wird. Auf der Membranoberseite sind leichte strukturelle Veränderungen durch die Plasmabehandlung zu beobachten. Bei einigen der langgezogenen Poren sind Aufschmelzungen zu sehen, was auf eine nicht unerhebliche thermische Belastung der Polymeroberfläche zurückzuführen ist. Durch Erhöhen der dielektrischen Barriere lässt sich dieser Prozess minimieren. Es ist zu erwarten, dass die Plasmabehandlung auf der Ober- und Unterseite unterschiedlich tief erfolgt (siehe Kapitel 4.1.7), da die Behandlungstiefe wie von Holländer experimentell bestätigt von der Porengröße abhängig ist.[165] Ein Anfärbungsexperiment mit einem hydrophilen Farbstoff (Abbildung 52 d) zeigt deutlich die Eignung einer porösen Membran für Bioassays. Die plasmabehandelten Bereiche sind gut benetzbar, während nicht behandelte Bereiche den ionischen Farbstoff Säurefuchsin abstoßen und die wässrige Farbstofflösung leicht abperlt. Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der mit NBD-F markierten Aminogruppen gibt die Morphologie der PP-Membran, wie sie in den REM-Aufnahmen ersichtlich ist, gut wieder (Abbildung 53). Das spricht für eine gleich-

mäßige Behandlung der Membranoberfläche. Es lassen sich Porenstrukturen unterhalb von  $0.5\ \mu\text{m}$  Größe auflösen.



**Abbildung 53:** Fluoreszenz gelabelter Aminogruppen auf einer plasmabehandelten PP-Membranoberfläche. Links ist die Oberseite zu sehen, rechts die Unterseite mit einem eingesetzten Bild höherer Auflösung. Die Intensitäten der beiden Bilder sind nicht direkt miteinander vergleichbar.

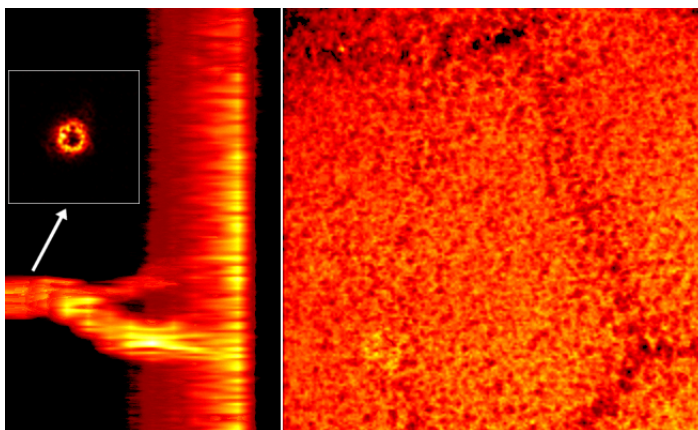
Allerdings ergeben sich aus den 2D-Bildern abgesehen von der Verteilung der Aminogruppendichte auf der PP-Membranoberfläche in Submikrometer-Auflösung keine weiteren Informationen. Bei der dreidimensionalen Untersuchung der Aminogruppendichte hingegen sind zusätzliche Informationen aus dem Inneren der Membran erreichbar, die mit keiner anderen Analysemethode erreicht werden kann (Abbildung 54).



**Abbildung 54:** Gerendertes 3D-Bild aus einem Tiefenscan der PP-Membranunterseite. Die Größe des gescannten Bereichs beträgt  $80 \times 80 \times 35\ \mu\text{m}^3$ .

Während bei den kompakten BOPP-Folien (Kapitel 4.1.1) nur Aussagen über die Rauheit der Oberfläche gemacht werden können, so zeigt sich bei den Membranen durch die poröse Struktur eine Aminierung durch die Plasmabehandlung bis in mehrere Mikrometer Tiefe relativ zur makroskopischen Oberfläche und damit in einer Größenordnung, die oberhalb des axialen Auflösungsvermögens des Mikroskops liegt. Darüber hinaus werden Prozesse sichtbar, die durch reine Analyse der Aminogruppendichte auf der Oberfläche verborgen bleiben.

Abbildung 55 links zeigt eine Aminierung der Membran in die Tiefe durch eine filamentäre Entladung. Die durch die Entladung entstandenen Aminogruppen sind ringförmig angeordnet, wahrscheinlich entsteht durch lokales Aufschmelzen des Polymers ein Hohlraum. Die Ursache des Phänomens wurde schon in Kapitel 4.1.1 behandelt (siehe auch Abbildung 32). Allerdings ist bei dieser Probe auf der Oberfläche das Filament gar nicht zu erkennen; in Abbildung 55 deutet es sich nur durch einen etwas helleren Bereich an. Eine Analyse der Fluoreszenzlebensdauer (hier nicht gezeigt) zeigt, dass diese identisch im Filament und in den oberen Schichten der Membran ist, so dass die Fluoreszenz im Filament gelabelten Aminogruppen zugeordnet werden kann.



**Abbildung 55:** Gerendertes 3D-Bild aus einem Tiefenscan einer plasmabehandelten und fluoreszenzmarkierten PP-Membranunterseite in Seitenansicht (links) und Aufsicht (rechts). Das Volumen des vermessenen Bereichs beträgt  $50 \times 50 \times 35 \mu\text{m}^3$ . Der Durchmesser des in der Seitenansicht sichtbaren Filaments beträgt circa  $4 \mu\text{m}$ ; das kleine Bild links zeigt das Filament im Querschnitt.

Aus den 3D-Scans lassen sich Intensitäts-Tiefenprofile erzeugen (wie in Abbildung 49 rechts) und damit die Behandlungstiefe quantifizieren. Dies ist einerseits für die Summe von primären und sekundären Aminogruppe durch NBD-F Markierung erfolgt, zum anderen auch durch Doppelmarkierung mit den zwei Farbstoffen NDA und SR101  $\text{SO}_2\text{Cl}$ . Daher erfolgt die Diskussion hierüber ausführlich nur in Kapitel 4.1.7.

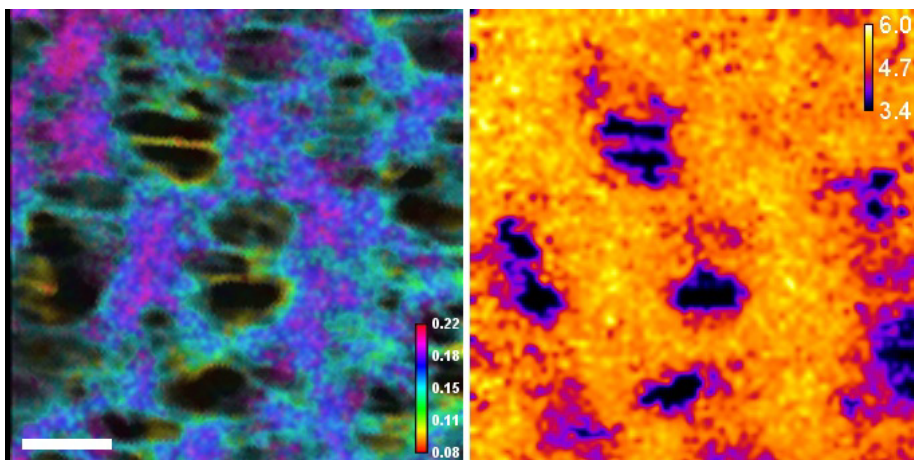
Eine weiterführende Analyse der molekularen Umgebung der an die Amine gebundenen Farbstoffmoleküle kann durch Fluoreszenzanisotropiemessungen erfolgen. Die aus der zeitaufgelösten Fluoreszenzanisotropie ermittelbare Rotationskorrelationszeit ist ein Indikator, wie stark die fluorophoren Gruppen an die polymere Mikroumgebung gebunden sind. Soll die Analyse orts aufgelöst erfolgen, so bedarf es im Vorhinein einer sehr hohen Intensität pro Pixel. Da zur Messung der Fluoreszenzanisotropie das detektierte Licht in zwei Kanäle aufgespalten wird und sich die Anisotropie gemäß Gleichung (2-21) durch Bildung einer Differenz und eines Quotienten errechnet, ist die Größe stark rauschanfällig. So lässt sich nur unter optimalen Bedingung, das heißt vor allem mit intensiv fluoreszierenden Farbstoffen, die



Fluoreszenzanisotropie gleichzeitig mit guter Orts- und Zeitauflösung bestimmen. Ein guter Kompromiss ist die Darstellung der zeitgemittelten beziehungsweise stationären Anisotropie  $\bar{r}$  durch Verrechnung der integralen Intensitätsbilder nach Gleichung (2-21). Die integrierte Form in Gleichung (4-5) gilt für einen monoexponentiellen Fluoreszenz- und Anisotropiezerfall.

$$\bar{r} = \frac{\int_0^{\infty} I(t) \cdot r(t) dt}{\int_0^{\infty} I(t) dt} = \frac{r_0}{1 + \tau/\theta} \quad (4-5)$$

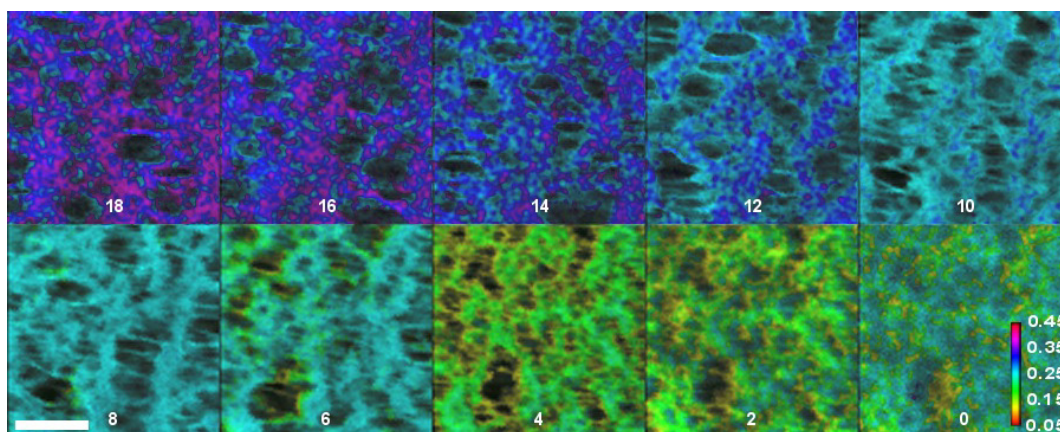
Hierbei ist zu beachten, dass die zeitgemittelte Anisotropie die initiale Anisotropie und Fluoreszenzlebensdauer des Fluorophors beinhaltet. Nur wenn diese konstant sind, gilt näherungsweise  $\bar{r} \propto \theta$ . Die erste Anforderung ist bei fester Anregungswellenlänge gegeben, die zweite hingegen kann nicht unbedingt vorausgesetzt werden; vor allem bei Fluorophoren, deren Fluoreszenzlebensdauer empfindlich gegenüber der Mikroumgebung ist. Dies ist bei NBD-F eindeutig der Fall (siehe Kapitel 3.4.1).



**Abbildung 56:** Darstellung der mittleren Anisotropie von mit NBD-F gelabelten Aminogruppen auf einer PP-Membranoberfläche im Falschfarbenbild (links). Das Bild ist eine Überlagerung aus Intensitätsbild (Integration über den gesamten Messbereich) und der Fluoreszenzanisotropie (vergleiche Abschnitt 4.1.2). Der weiße Balken entspricht 10 µm. Rechts ist die Fluoreszenzlebensdauer desselben Ausschnitts gezeigt. Die Zeitskala ist in Nanosekunden angegeben.

Die Abbildung 56 zeigt deutliche Unterschiede der stationären Anisotropie auf der PP-Membranoberfläche. Da das aufgenommene Bild ein optischer Schnitt durch die Probe ist, werden sowohl Moleküle direkt an der äußeren Oberfläche registriert, die schneller rotieren können und daher eine niedrigere stationäre Anisotropie zeigen, als auch Moleküle, die tiefer im Polymer, zum Beispiel in kleinen Poren oder Taschen sitzen und durch Wechselwirkung mit dem Polymer langsamer rotieren. Die Analyse der Fluoreszenzlebensdauer zeigt eine relativ homogene Verteilung. An den Poren beziehungsweise direkt an der Oberfläche ist eine

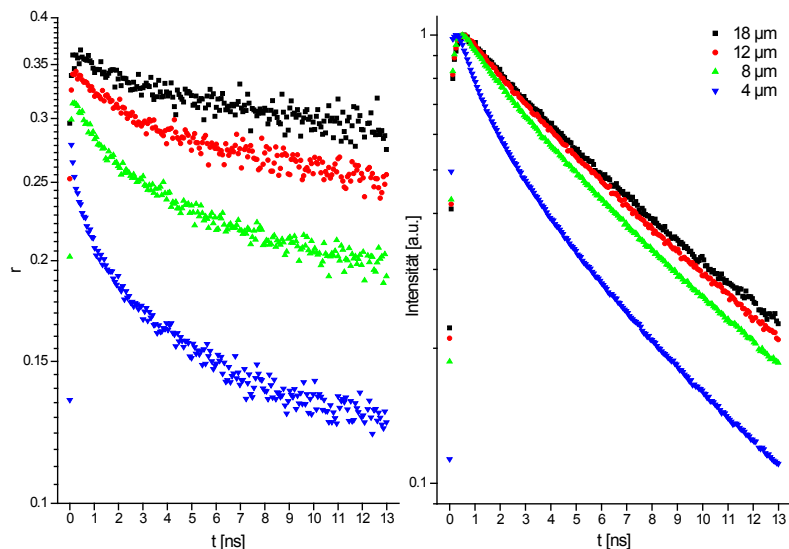
niedrigere Lebensdauer zu beobachten. Gemäß Gleichung (4-5) erhöht eine niedrigere Lebensdauer aber die gemessene stationäre Anisotropie, so dass in Abbildung 56 links die Unterschiede in der Rotation noch deutlicher ausfallen würden als es die Unterschiede in der Darstellung der stationären Anisotropie bereits verdeutlichen. Interessant ist natürlich auch, inwieweit sich die Fluoreszenzanisotropie mit zunehmender Tiefe verändert. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abbildung 57 zu finden.



**Abbildung 57:** Tiefenabhängigkeit der mittleren Anisotropie auf der Oberseite einer PP-Membran. Der weiße Balken entspricht 10 µm. Die Zahlen geben den Abstand von der äußeren Oberfläche unten rechts in Mikrometern an. Die Intensitätsinformation in jedem Bild ist normalisiert, um eine optimale Visualisierung und eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den Bildern zu schaffen.

Es ist ein eindeutiger Trend zu höheren stationären Anisotropien mit zunehmender Tiefe zu erkennen. Jedoch muss auch bei dieser Messung die Kontrolle der Fluoreszenzlebensdauer erfolgen. Dazu sind in Abbildung 58 vier ausgewählte zeitaufgelöste Anisotropie- und Fluoreszenzzerfallskurven dargestellt, die über den gesamten Bereich von  $30 \times 30 \mu\text{m}^2$  integriert und gemittelt sind. Während in größerer Tiefe die Fluoreszenzlebensdauer relativ konstant ist, so wird sie für die Moleküle nahe der äußeren Oberfläche kürzer. Dies könnte durch Fluoreszenzselbstlöschung aufgrund von hohen Aminogruppendichten nahe der äußeren Oberfläche zu erklären sein; die Intensitäten sind zur besseren Darstellbarkeit für alle Bilder normiert, obwohl ein exponentieller Abfall der Intensität mit der Tiefe beobachtet wird. Wie bereits diskutiert sind dadurch die sichtbaren Unterschiede in der Rotation der Moleküle in Abbildung 57 zwischen der äußeren Oberfläche und tieferen Bereiche eher noch größer. Die Anisotropieabklingkurven in Abbildung 58 zeigen einen leichten Versatz der initialen Anisotropie. Dies kann zum einen der Tatsache zuzurechnen sein, dass für diese Berechnungen kein G-Faktor für jedes Einzelbild ermittelt wurde, sondern nur vor Beginn der Messung die Detektionskanäle gleich empfindlich gestellt wurden, so dass sich ein G-Faktor von eins ergibt. Zum anderen ist auch der Einfluss der IRF nicht zu vernachlässigen, der die messbare initiale Anisotropie bei schnellen Anisotropiezerfällen stärker vermindert als bei langsamen. Abgesehen davon sind aber deutliche Unterschiede im Anisotropiezerfall zu er-

kennen, die die Ergebnisse aus der orts aufgelösten stationären Anisotropie untermauern. Daher eignen sich die Darstellungen in Abbildung 56 und Abbildung 57 auf jeden Fall für eine qualitative Diskussion der Mikroumgebung der an Aminogruppen gebundenen Farbstoffmoleküle, solange gleichzeitig eine Kontrolle der Fluoreszenzlebensdauer erfolgt.



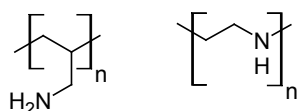
**Abbildung 58:** Räumlich integrierte Anisotropie- (links) und Fluoreszenzzerfallskurven (rechts) für ausgewählte Tiefen der in Abbildung 57 gezeigten Messung.

#### 4.1.6 Amindiskriminierung durch NBD-F

Die bisher gezeigten Intensitätsbilder zeigen entweder nur die Aminogruppenverteilung von primären Aminen, falls die Proben mit Fluorescamin gelabelt sind, oder primäre und sekundäre Amine bei Verwendung von NBD-F. Dabei besteht grundsätzliches Interesse, primäre und sekundäre Amine orts aufgelöst quantifizieren zu können. Zum einen um die bei der Plasmabehandlung ablaufenden Prozesse, die zu primären oder sekundären Aminen führen können, besser verstehen zu können. Zum anderen ist eine Optimierung des Plasmaprozesses selektiv auf primäre Aminogruppen hin wünschenswert, da diese reaktiver als sekundäre Amine sind und manche nachfolgenden Reaktionsschritte nur mit primären Aminen ablaufen. Grundsätzlich gibt es nur zwei Arten von aminspezifischen Farbstoffen – die, die nur mit primären Aminen reagieren oder die, die beide Sorten markieren. Zur simultanen Unterscheidung von Aminen eignet sich ein konsekutives Doppellabeling, wie es in Kapitel 4.1.7 durchgeführt wird. Nachteilig ist bei diesem Verfahren die Notwendigkeit von zwei hintereinander ablaufenden Labelprozeduren. Daher wird NBD-F als Ein-Farbstoff Alternative untersucht. Der Farbstoff ist sehr umgebungsempfindlich (siehe Kapitel 3.4.1) und ändert seine Eigenschaften auch je nach Reaktion mit einem primären oder sekundären Amin.[80,166] Mit der zeitaufgelösten Fluoreszenzdetektion lassen sich Unterschiede in der Fluoreszenzlebensdauer und Fluoreszenzanisotropie für primäre und sekundäre Amine

herausarbeiten. Da die Zusammensetzung aus primären und sekundären Aminen auf plasma-behandelten Oberflächen unbekannt ist, bedarf es geeigneter Referenzen mit bekannter Zusammensetzung. Dabei ist es äußerst wichtig, dass die Referenzen chemisch möglichst nah an den Proben sind. Neben der bei Fluorophoren allgemeinen Abhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauer und damit der Quantenausbeute vom Brechungsindex des umgebenden Medium werden bei NBD-F auch starke Einflüsse von Polarität, Viskosität und zwischenmolekularen Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindungen beobachtet, die sich allesamt auf die Fluoreszenzlebensdauer oder auch Fluoreszenzanisotropie auswirken.[99,167]

Die Untersuchungen wurden mit NBD-F in Lösung begonnen, da diese homogen und leicht reproduzierbar sind. Als Lösungsmittel eignen sich unpolare Kohlenwasserstoffe, die in dieser Hinsicht dem Polypropylen sehr ähnlich sind. Dodecan und Paraffin unterscheiden sich im Wesentlichen durch ihre Kettenlänge, wobei Paraffin ein Gemisch verschieden langer Kohlenwasserstoffe ist. Während Dodecan niederviskos ist ( $1.383 \text{ mPa}\cdot\text{s}^{-1}$  bei  $25^\circ\text{C}$ )[168], ist Paraffin deutlich viskoser ( $100\text{-}145 \text{ mPa}\cdot\text{s}^{-1}$  bei  $20^\circ\text{C}$ , Herstellerangabe Fluka). Der Farbstoff NBD-F wird mit aliphatischem Octyl- beziehungsweise Dibutylamin umgesetzt, die beide dieselbe Summenformel besitzen, so dass sich durch die Molekularmasse kein Einfluss auf die Ergebnisse ergeben kann. Natürlich kann eine homogene Lösung nicht die molekulare Situation auf einer Polypropylenoberfläche genügend ähnlich nachbilden. Geeigneter sind hierzu Polyelektrolyte, das sind in diesem Fall die polymeren Amine Polyallylamin und lineares Polyethylenimin.[169]



**Abbildung 59:** Strukturformel von Polyallylamin (links) und linearem Polyethylenimin (rechts).

Wenn die Derivatisierung der Aminogruppen in einem unpolaren Lösungsmittel erfolgt, so werden die Polyelektrolyte nicht gelöst. Eingebettet in einem unpolaren Immersionsmittel ergibt sich somit eine mit einer PP-Folie vergleichbare molekulare Umgebung für die Fluorophore. Sie sitzen auf der Oberfläche des Polymers an einer Grenzfläche zu einer Flüssigkeit. Eine weitere Möglichkeit ergibt sich durch selektive Erzeugung von primären oder sekundären Aminen auf plasma-aminierter Oberfläche durch Festphasen-Peptidsynthese. Das Verfahren ist bereits in Kapitel 3.4.2 (da vor allem Abbildung 19) vorgestellt worden. Die Methode ist dahingehend der optimale Ansatz, als dass dasselbe Polymersubstrat verwendet wird und nur minimale chemische Veränderungen erfolgen. Um den Einfluss der verwendeten Aminosäure zu untersuchen, lassen sich Aminosäuren mit unterschiedlicher Kettenlänge verwenden, so zum Beispiel Glycin für eine steife Bindung zur Polymeroberfläche und

6-Aminohexansäure für eine lockerere Bindung. Nachteilig ist die Einfügung von sekundären und tertiären Amidgruppen auf die Oberfläche, wovon erstere potentiell mit NBD-F zu einem fluoreszierenden Produkt reagieren könnte. In einem Kontrollexperiment mit einem primären Amin, sekundären Amin und einem sekundären Amid konnte gezeigt werden, dass eventuelle Fluoreszenz von einem sekundären Amid vernachlässigt werden kann. Für alle drei Referenzsysteme (Lösung, Polyelektrolyt, Aminosäure auf PP-Membran) sind Untersuchungen der Fluoreszenzlebensdauer und Fluoreszenzanisotropie für primäre und sekundäre Amine erfolgt und werden mit einer plasma-aminieren PP-Membran unbekannter Zusammensetzung verglichen.

**Tabelle 3:** Fluoreszenzlebensdaueranalyse von NBD-F für verschiedene Referenzsysteme mit jeweils einer Sorte Amine und einer PP-Membran unbekannter Aminzusammensetzung.

Probenart			$F_1$		$\pm$	$\tau_1$	$\pm$	$F_2$		$\pm$	$\tau_2$	$\pm$
						ns			ns			
PP-Membran	Plasma	NH <sub>x</sub>	0.85	0.05		6.56	0.39	0.15	0.05		1.56	0.42
PP-Membran Aminosäure	Glycin	NH <sub>2</sub>	0.82	0.07		5.92	0.41	0.18	0.07		1.20	0.19
	β-Alanin	NH <sub>2</sub>	0.80	0.07		6.48	0.90	0.20	0.07		1.31	0.49
	Prolin	NH	0.83	0.04		6.49	0.14	0.17	0.04		1.32	0.03
Polyelektrolyt	Polyallylamin	NH <sub>2</sub>	0.39	0.10		2.44	0.10	0.61	0.10		0.51	0.27
	Polyethylenimin	NH	0.37	0.07		2.13	0.45	0.63	0.07		0.40	0.10
Paraffin	Octylamin	NH <sub>2</sub>	0.15	0.01		8.20	0.04	0.85	0.01		0.47	0.01
	Dibutylamin	NH	-	-		8.05	0.05	-	-		-	-
Dodecan	Octylamin	NH <sub>2</sub>	0.27	0.05		7.99	0.02	0.73	0.05		0.44	0.01
	Dibutylamin	NH	-	-		7.12	0.01	-	-		-	-

Der Fluoreszenzzerfall zeigt außer für Dibutylamin in Lösung ein biexponentielles Verhalten. Die erhaltenen Ergebnisse in Lösung sind konsistent mit den Ergebnissen von Fery-Forgues *et al.*, die für *n*-Propylamino-NBD in *n*-Hexan und Cyclohexan zwei Lebensdauern (und einen schwachen dritten Beitrag) finden, für *N,N*-Dimethylamino-NBD hingegen nur eine Lebensdauer.[97] Das Verhältnis von langer zu kurzer Fluoreszenzlebensdauer liegt für die Membran-Proben und die Polyelektrolyte zwischen 4.2 und 5.3, für Octylamin in Lösung hingegen bei etwa 18. Auch die Anteile der Fluoreszenzlebensdauer am Fluoreszenzzerfall sind für die jeweilige Probenart ähnlich. Im Vergleich zu den PP-Membranen ist die Fluoreszenzlebensdauer bei den Polyelektrolyten deutlich verringert. Wahrscheinlich ergibt sich durch zu hohe Farbstoffkonzentrationen auf der Oberfläche intermolekulare Fluoreszenzlöschung, obwohl schon ein Verhältnis von Aminogruppen zu Farbstoff von 100:1 ge-



wählt wurde. Ansonsten ergibt sich sowohl für Membranoberflächen, als auch für Polyelektrolyte keine Möglichkeit zur Unterscheidung von primären und sekundären Aminen. In Lösung ließe sich durch eine ratiometrische Bestimmung der Vorfaktoren über einen Bereich nicht zu stark verschiedener Konzentration von primären und sekundären Aminen diese unterscheiden, da die kurze Fluoreszenzlebensdauer nur bei primären Aminaddukten beobachtet wird.

**Tabelle 4:** Fluoreszenzanisotropieanalyse von NBD-F für verschiedene Referenzsysteme mit jeweils einer Sorte Amine und einer PP-Membran unbekannter Aminzusammensetzung.

Probenart			$g_1$	$\pm$	$\theta_1$	$\pm$	$g_2$	$\pm$	$\theta_2$	$\pm$	$g_\infty$	$\pm$	$r_0$	$\pm$
			ns				ns							
<b>PP-M</b>	Plasma	NH <sub>x</sub>	0.24	0.01	0.68	0.08	0.24	0.01	6.44	1.27	0.52	0.02	0.25	0.01
<b>PP-M</b>	Glycin	NH <sub>2</sub>	0.15	0.04	0.68	0.13	0.19	0.02	6.45	1.25	0.66	0.04	0.25	0.02
<b>Amino-</b>	$\beta$ -Alanin	NH <sub>2</sub>	0.20	0.02	0.74	0.12	0.23	0.02	6.75	2.53	0.58	0.03	0.24	0.01
<b>säure</b>	Prolin	NH	0.23	0.02	0.58	0.10	0.31	0.02	5.24	0.78	0.46	0.02	0.24	0.01
<b>Paraffin</b>	Octyl-amin	NH <sub>2</sub>	0.41	0.01	0.51	0.02	0.59	0.01	2.24	0.04	-	-	0.25	0.01
	Dibutyl-amin	NH	0.40	0.02	1.06	0.04	0.60	0.02	2.46	0.08	-	-	0.23	0.01
<b>Dodecan</b>	Octyl-amin	NH <sub>2</sub>	0.74	0.03	0.08	0.01	0.26	0.03	0.31	0.03	-	-	0.23	0.01
	Dibutyl-amin	NH	0.69	0.10	0.09	0.01	0.31	0.1	0.21	0.04	-	-	0.14	0.03

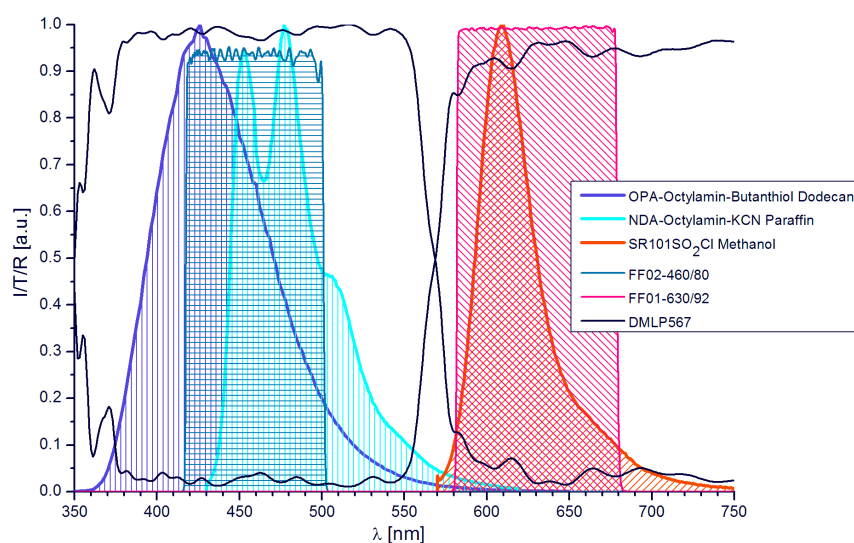
Bei der Analyse des Fluoreszenzanisotropiezerfalls zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei der Fluoreszenzlebensdaueranalyse. Aus den Ergebnissen zur Festphasen-Peptidsynthese lassen sich keine Unterschiede in der Fluoreszenzanisotropie herausarbeiten. Für die Polyelektrolyte ergeben sich stark unterschiedliche Zerfallskurven, die sich zum Teil nicht erfolgreich einer Funktionsanpassung unterziehen lassen. Dies mag zum Teil auch den stark heterogenen Proben aufgrund schwieriger Probenpräparation zuzuschreiben sein. Daher sind in Tabelle 4 keine Ergebnisse aufgeführt. Für die Ergebnisse in Lösung lassen sich hingegen Unterschied im Anisotropiezerfall herausarbeiten. Untersuchungen von Greenough und Blanchard haben ergeben, dass das Verhältnis der Rotationsdiffusionskoeffizienten von der Achse senkrecht zum  $\pi$ -System und langer Achse der Molekülebene circa zwei für NBD-Fluorophore beträgt.[99] Dies ergibt ein Verhältnis der Rotationskorrelationszeiten von 3:2 für einen prolaten Ellipsoid beziehungsweise 5:3 für einen oblaten Ellipsoid, beide mit Übergangsdipolmomenten senkrecht zur ungleichen Achse. In den experimentellen

Ergebnissen finden sich zum Teil deutlich höhere Verhältnisse wieder. Interessanterweise liegt das Verhältnis von langer zu kurzer Rotationskorrelationszeit in Paraffin bei circa 60:40, in Dodecan hingegen 30:70. Somit ist keine eindeutige Zuordnung zu einer eher prolaten oder oblaten Form des Moleküls möglich. Von den Ergebnissen aus den Untersuchungen in Lösung ist für die Aminunterscheidung nur Paraffin aufgrund seiner hohen Viskosität relevant. Hier zeigt sich ein Unterschied in der kürzeren Rotationskorrelationzeit um einen Faktor zwei für die zwei Aminosorten. Daher lassen sich primäre und sekundäre Amine in Lösung unter der Voraussetzung nicht zu unterschiedlicher Konzentrationen durch Fluoreszenzanisotropiemessungen unterscheiden. Allerdings zeigt die Untersuchung deutlich, dass zumindest für NBD-F kein Transfer von Ergebnissen aus Messungen in Lösung auf Feststoffe beziehungsweise heterogene fest-flüssig Systeme übertragen werden kann und selbst die Ergebnisse in zwei ähnlichen Lösungsmitteln bereits unterschiedlich ausfallen können. Der Farbstoff NBD-F eignet sich daher nicht zur Unterscheidung von primären und sekundären Aminen auf Polymeroberflächen. Daher wird zur Unterscheidung von primären und sekundären Aminen auf Oberfläche der Doppelmarkierungsansatz intensiver verfolgt.

#### 4.1.7 Amindiskriminierung durch Doppellabeling

Bereits in Kapitel 4.1.6 ist erwähnt worden, dass es keine Farbstoffe gibt, die selektiv nur mit sekundären Aminen reagieren. Allerdings gibt es Farbstoffe, die selektiv nur mit primären Aminen reagieren und dabei auch noch fluorogen sind. Von der Struktur her sind OPA und NDA als aromatische 1,2-Dialdehyde einzuordnen (siehe Kapitel 3.4.1). Zur Bildung eines stabilen Endprodukts muss die Aminogruppen zweimal mit den Aldehydgruppen unter Abgabe eines Protons reagieren; dies ist nur mit primären Aminen möglich. Die Reaktion mit vergleichbar reaktiven sekundären Aminen ergibt kein stabiles Produkt und ist reversibel. Daher stehen nach der Labelingprozedur die sekundären Amine auf der Probenoberfläche für eine weitere Reaktion zur Verfügung. Dabei ist wichtig, dass die primären Amine quantitativ umgesetzt werden, da sonst nicht markierte primäre Amine mit dem zweiten Farbstoff markiert werden könnten und dann fälschlicherweise als sekundäre Amine detektiert werden. Indem die Farbstofflösung im großen Überschuss zu den Aminogruppen gegeben wird, sollte das Reaktionsgleichgewicht weit auf der Seite der Produkte liegen. Allerdings findet die Reaktion nicht in Lösung statt, sondern an der Grenzfläche flüssig-fest, so dass hier Diffusionsprozesse geschwindigkeitsbestimmend sein können. Die Verwendung einer Schüttelplatte während der Labelingprozedur wäre hier von Vorteil. Die Auswahl des zweiten Farbstoffes erfolgt nach spektralen Gesichtspunkten, das heißt die Fluoreszenz der beiden Farbstoffe sollte möglichst weit auseinander liegen, um übersprechende Signale (*crosstalk*)

zu vermeiden. Natürlich spielen auch Aspekte wie die Stabilität des Fluorophors, simultane Anregbarkeit der Farbstoffe und Helligkeit (Produkt aus Absorptionsquerschnitt und Quantenausbeute) eine Rolle. Sulforhodamin 101 erfüllt alle Anforderungen als zweiten Labelfarbstoff. Es ist mit Sulfonylchlorid als reaktive Gruppe kommerziell erhältlich. Nachteilig ist, dass die Sulfonylchloridgruppe nicht spezifisch nur mit Aminen reagiert und dass SR101 nicht fluorogen ist. Die Reaktion mit Hydroxygruppen auf der Substratoberfläche ist aufgrund deutlich geringerer Nucleophilie sehr langsam, so dass von etwaigen Hydroxygruppen keine signifikante Störquelle zu erwarten ist. Alternativ kann auch ein Succinimidylester als reaktive Gruppe genutzt werden, die fast ausschließlich mit Aminen reagiert.[107] Die Fluoreszenzspektren der Farbstoffe OPA, NDA und SR101 sind zusammen mit den in den Experimenten verwendeten Interferenzfiltern und dem dichroitischen Spiegel in Abbildung 60 gegenübergestellt. OPA und NDA sind in unpolaren Kohlenwasserstoffen vermessen, SR101 löst sich als Zwitterion hingegen nur in polaren Lösungsmitteln. Da das Sulforhodamin nur schwach solvatochrom ist, ergeben sich aber hieraus keine qualitativen Abweichungen.\*



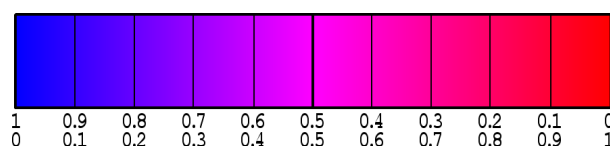
**Abbildung 60:** Emissionsspektren der verwendeten Farbstoffe als Amin-Addukte in Lösungsmittel und Transmissionsspektren der verwendeten Fluoreszenzfilter beziehungsweise des dichroitischen Spiegels der Hersteller. Die Transmissionswerte für die Fluoreszenzfilter und den dichroitischen Spiegel sind absolute Werte, die Reflektion des Dichroiten ist über  $R = 1 - T$  errechnet, die Fluoreszenzspektren sind normiert.

Die Fluoreszenz vom NDA-Addukt ist um circa 50 nm gegenüber dem OPA-Addukt rotverschoben. Das hat zur Folge, dass ein geringer Teil der NDA-Fluoreszenz in den langwelligen Kanal gelangt, also liegt hier Crosstalk vor. Allerdings beträgt der Anteil an der

\* Für Messungen des Fluoreszenzspektrum von Sulforhodamin 101 in Methanol und Dodecan ergibt sich ein Unterschied im Emissionsmaximum von nur 7 nm. Für NDA ist der Unterschied praktisch nicht messbar, nur die Schulter bei 505 nm ist unterschiedlich stark ausgeprägt.

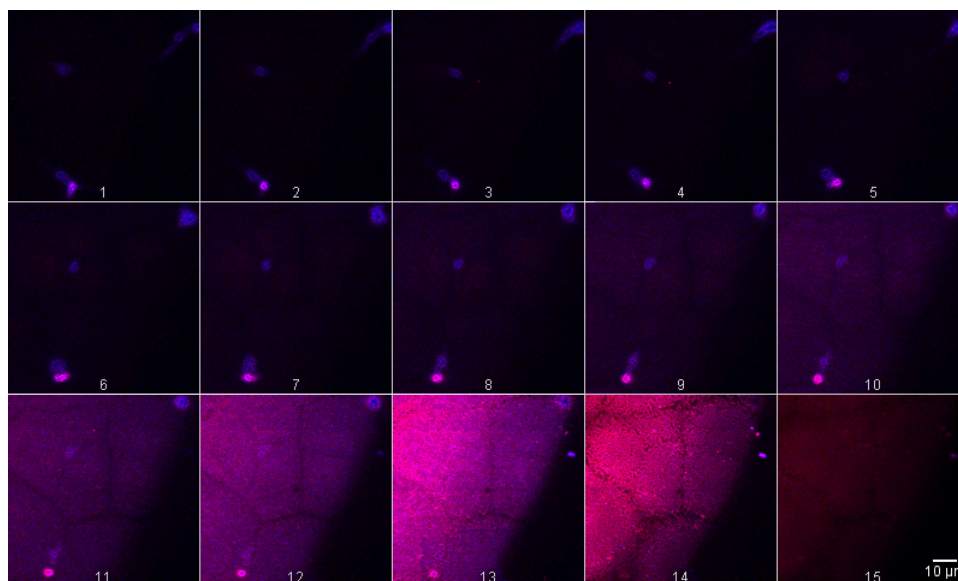
Gesamtfluoreszenz im langwelligen Detektionskanal theoretisch nur 1.5% ( $\lambda > 580$  nm) im Vergleich zu 75.5% im kurzwelligen Kanal ( $416 \text{ nm} < \lambda < 503 \text{ nm}$ , Bereich der Filter mit weniger als 1% Transmission). Außerdem ist die Fluoreszenzintensität mit diesem Aufbau für gleiche Konzentrationen von Sulforhodamin 101 bei einer Anregungswellenlänge von 830 nm in etwa 100-fach stärker als die vom NDA-Addukt. Aufgrund des relativen kleinen Dynamikbereichs der APD wurde daher die Detektionseffizienz des langwelligen Kanals durch Dejustage künstlich verschlechtert beziehungsweise für quantitative Messungen ein 5% Neutralfilter in den Detektionspfad eingeführt. Als großer Vorteil der Verwendung von NDA zur Markierung primärer Amine erweist sich höhere die Stabilität des Fluorophors im Vergleich zu OPA. OPA-behandelte Folien weisen eine signifikante Intensitätsabnahme innerhalb weniger Stunden auf. Untersuchungen unter anderen Bedingungen haben ergeben, dass OPA nicht langzeitstabil ist.[102] Jedoch zeigen Untersuchungen, dass es bei quantitativen Messungen sinnvoll ist, auch NDA-behandelte Proben noch am selben Tag zu vermessen, da auch bei dem NDA-Addukt ein langsamer Abbau zu beobachten ist. Optimal ist eine Lagerung in kühler, dunkler und sauerstofffreier Umgebung bis zur eigentlichen Messung.

Aus den Daten der Messungen ergeben sich für jede abgerasterte Fläche aus den zwei Detektionskanälen zwei separate Bilder. Diese können getrennt dargestellt und analysiert werden. Es lässt sich aber aus den Daten auch ein RGB-Kompositbild erzeugen, indem den Intensitätswerten im Kanal für NDA willkürlich der blaue Farbkanal und für die Intensitäten im SR101-Kanal der rote Farbkanal zugeordnet wird. (Dies entspricht in etwa der Farbe der Fluoreszenz der beiden Stoffe.) Sind in einem Pixel in beiden Kanälen von Null verschiedene Intensitätswerte vorhanden, so addieren sich diese je nach Helligkeitsverhältnis zu den in Abbildung 61 dargestellten Farben.



**Abbildung 61:** Farbskala für die Addition der Farben rot und blau im RGB-Farbraum. Die erste Zahlenreihe gibt dabei den Beitrag der blauen Farben zu der Farbsumme an, die zweite Zahlenreihe den Beitrag für die Farbe Rot.

Einschränkend ist zu beachten, dass für jeden Kanal der Minimal- und Maximalwert erst einmal beliebig gewählt werden kann und ohne Kalibrierung auch keine Aussage über den absoluten Anteil von primären und sekundären Aminen getroffen werden kann, so dass die Skala in diesem Fall keine quantitative Aussagekraft hat. Allerdings lassen sich auch ohne Kalibrierung bereits qualitative Aussagen sowie quantitative Aussagen über die Tiefenbehandlung treffen.



**Abbildung 62:** 3D-Tiefenscan der Unterseite einer PP-Membran mit simultaner Darstellung von primären Aminen (blau) und sekundären Aminen (rot). Der Abstand zwischen zwei Bildern beträgt 2 µm.

So zeigt sich bei dem in Abbildung 62 dargestellten Tiefenscan, dass die Verteilung von primären und sekundären Aminen recht homogen ist. Bei den hier auftretenden Filamenten, die weit in die Membran hineinreichen, bestehen einige mehrheitlich aus primären Aminen (blau), andere Filamente sind aus der gleichen Zusammensetzung primärer und sekundärer Amine wie die Membranoberfläche (Magenta). Dies wirft interessante Fragen zu den ablaufenden Mechanismen der Aminierung im Plasma auf, die durch diese Analysemethode näher untersucht werden können.

Desweiteren lassen sich die Behandlungstiefen für primäre und sekundäre Amine vergleichen. Da für beide Aminosorten unterschiedliche Entstehungsmechanismen möglich sind, könnten hieraus Unterschiede in der Behandlungstiefe der Membran resultieren. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Die Größe  $\zeta$  ist der  $1/e$ -Wert der an den fallenden Teil des Intensitätsprofils angepasste Exponentialfunktion. Die gemessenen Intensitätsprofile ähneln dabei dem gezeigten Profil für eine Hohlfasermembran (Abbildung 49 rechts) und sind daher nicht noch einmal dargestellt.

**Tabelle 5:** Mittlere Eindringtiefen für primäre und sekundäre Amine auf der Membranober- und Unterseite sowie mit oder ohne extra BOPP-Folie als zusätzliches Dielektrikum. Die Zahl  $N$  gibt dabei die Zahl der Einzelmessungen an, die an verschiedenen Stellen eines Spots und verschiedenen Spots einer Probe durchgeführt wurden.

		$\zeta\text{NH}_2$	$\pm$	$\zeta\text{NH}$	$\pm$	Verhältnis	$\pm$	$N$
		$\mu\text{m}$				$\zeta(\text{NH}_2)/\zeta(\text{NH})$		
<b>PP-M</b> <b>Oberseite</b>	mit BOPP	4.01	0.35	3.63	0.32	1.10	0.14	20
	ohne BOPP	5.51	0.98	4.14	0.47	1.33	0.28	16
<b>PP-M</b> <b>Unterseite</b>	mit BOPP	5.15	0.71	3.91	0.40	1.32	0.23	12
	ohne BOPP	3.33	0.30	3.57	0.29	0.93	0.11	27

Es wird unterschieden, ob die Membranoberseite oder -unterseite behandelt ist und ob zusätzlich 75  $\mu\text{m}$  BOPP-Folie als Dielektrikum verwendet wurde (siehe hierzu Kapitel 4.1.5). Auch wenn die Ergebnisse sich aufgrund der hohen Anzahl an Einzelmessungen teilweise mit 95%iger Sicherheit unterscheiden werden können, sind hier keine klaren Trends erkennbar. Dies liegt vor allem daran, dass die Polymersubstrate kein homogenes Gebilde sind, so dass auch keine homogene Behandlung über die ganze Fläche erwartet werden kann. Außerdem brennt das Plasma auch nicht in allen Kavitäten gleich stark. Dementsprechend ist die Behandlungstiefe für primäre und sekundäre Amine auf PP-Membranen mit entsprechenden Schwankungen ungefähr gleich groß.

#### *Quantifizierung primärer und sekundärer Amine*

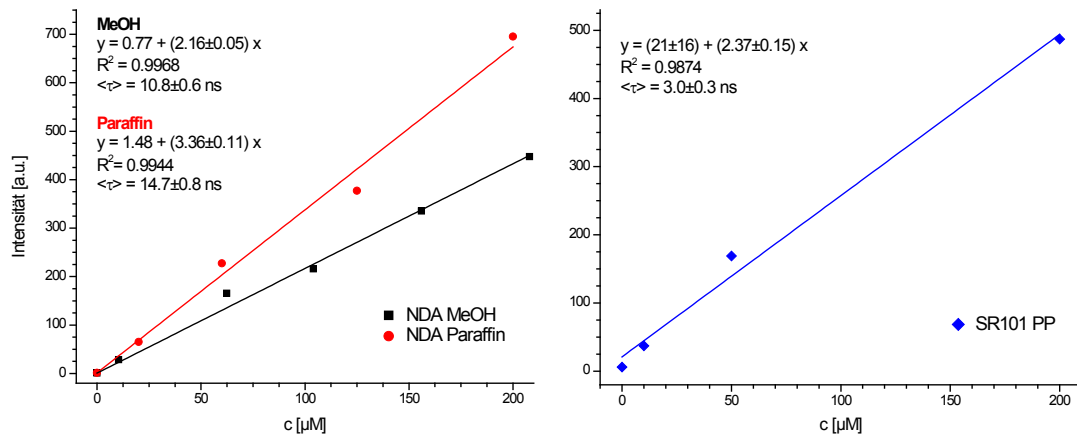
Die Umrechnung von gemessenen Intensitäten in einem Pixel in eine Konzentration ist ein sehr aufwendiger Vorgang. Um zuverlässige Ergebnisse zu erhalten, müssen zwei Voraussetzungen erfüllt. Erstens muss eine geeignete Referenz mit bekannter Konzentration gefunden werden. Bereits bei der Untersuchung von NBD-F als Farbstoff zur Aminunterscheidung (Kapitel 4.1.6) zeigte sich, dass eine Referenz möglichst nah an der zu vermessenden Probe äußerst wichtig ist. Zweitens müssen sämtliche Messparameter für die Referenz- und Probenmessungen identisch sein. Das heißt konkret, dass neben dem exakt gleichen experimentellen Aufbau auch die gleiche Anregungswellenlänge und -leistung und gleiche Messparameter wie Scangeschwindigkeit oder Pixelauflösung vorliegen müssen. Nachdem die Referenzen vermessen sind und Kalibriergeraden erstellt worden sind, lässt sich mit einer Kalibrierlösung Konstanz über mehrere Messtage realisieren. Dazu wird eine Mischung aus

Cumarin 47 (7-Diethylamino-4-methylcumarin, Emissionsmaximum 445 nm in Ethanol) und Sulforhodamin 101 benutzt und die Intensitätswerte auf den Detektoren kontrolliert. Cumarin-Farbstoffe eignen sich besser zur Kontrolle, da sie deutlich stabiler sind als das fluoreszierende NDA-Addukt. Zur Herstellung der Referenzen wird eine eingewogene Menge an Polypropylen in *p*-Xylol unter Erwärmen in einem bestimmten Volumen gelöst und eine bestimmte Stoffmenge an Farbstoff der Lösung hinzugefügt. Der Prozess ist detailliert in Kapitel 3.4.2 beschrieben. Nachteilig bei dieser Methode ist, dass Polypropylen sehr stabil gegenüber Lösungsmitteln ist und bei Raumtemperatur nicht vollständig gelöst werden kann; meist ist nur ein Aufquellen des Polymers zu beobachten. Die auch nur kurzzeitig benötigten hohen Temperatur zum Lösen von PP sind problematisch für die Stabilität des NDA-Addukts, so dass hierdurch ein signifikanter systematischer Fehler erwartet werden kann. Daher wird die Konzentrationsreihe für NDA in Lösung aufgestellt. Zusätzlich wird die Fluoreszenzlebensdauer bestimmt und mit den Lebensdauern von NDA im gebundenen Zustand an Aminogruppen auf der PP-Oberfläche verglichen. Gemäß Gleichung (2-14) ist die Fluoreszenzlebensdauer direkt proportional zur Quantenausbeute, so dass hierdurch noch ein Korrekturfaktor eingeführt werden kann. Auf der PP-Oberfläche ist aufgrund verschiedener Mikroumgebungen keine Monoexponentialität gegeben, so dass hier eine mittlere Lebensdauer berechnet wird. Dafür gibt es zwei Möglichkeiten, die in Gleichung (4-6) gegenübergestellt sind.

$$\bar{\tau}_{\text{ave}} = \frac{\sum_i F_i \cdot \tau_i^2}{\sum_i F_i \cdot \tau_i}, \quad \bar{\tau}_{\text{int}} = \frac{\sum_i F_i \cdot \tau_i}{\sum_i F_i} \quad (4-6)$$

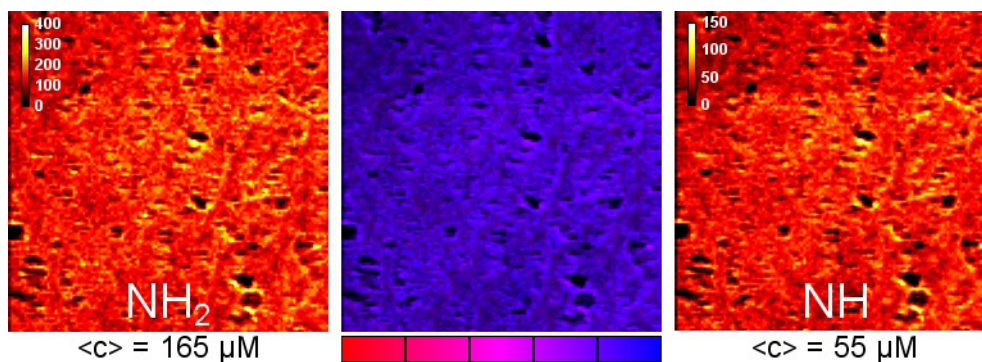
Während die linke Gleichung die häufiger verwendete Gleichung ist und die mittlere Zeit des Fluorophors im angeregten Zustand angibt, so ist die rechte Größe proportional zur Gesamtintensität. Da diese in Relation zur Konzentration gesetzt wird, wird die rechte Gleichung verwendet. Wichtig ist außerdem noch, dass die Solvatochromie des Farbstoffs vernachlässigbar ist, da nicht die integrale Fluoreszenz detektiert wird, sondern nur der Anteil, der den jeweiligen Interferenzfilter passiert. Es wurde überprüft, dass für beide Farbstoffe die Solvatochromie gering ist und damit keine relevante systematische Fehlerquelle besteht.





**Abbildung 63:** Konzentration-Intensität Kalibriergeraden für NDA (links) und Sulforhodamin 101 (rechts).

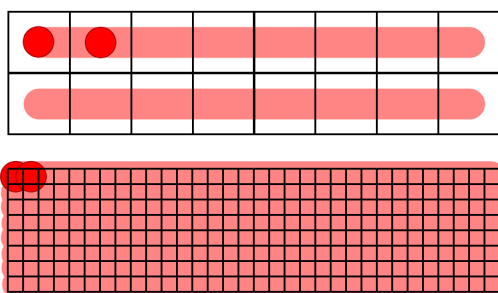
Für die Lösungsmittel Paraffin und Methanol ergibt sich ein Verhältnis der Fluoreszenzlebensdauern von  $1.4 \pm 0.1$  beziehungsweise  $1.55 \pm 0.09$  für das Verhältnis der Steigungen. Da sich hier eine relativ gute Übereinstimmung ergibt, kann somit durch Bestimmen der Fluoreszenzlebensdauer von NDA auf der PP-Oberfläche die absolute lokale Konzentration bestimmt werden. Für Sulforhodamin 101 hingegen lassen sich die Polypropylen-Referenzproben erstellen. Rhodamin B, ein chemisch nah verwandtes Molekül, ist temperaturstabil und zersetzt sich erst ab einer Temperatur von  $210^\circ\text{C}$ .<sup>[170,171]</sup> Hier ist nachteilig die Schwierigkeit der reproduzierbaren Probenpräparation durch Eindampfen von PP-Farbstofflösung im Vergleich zu einer homogenen Farbstofflösung zu erwähnen. Dadurch streuen die Einzelmesswerte relativ stark. Durch eine ausreichende Anzahl von Messungen lassen sich aber so trotzdem zuverlässige Kalibriergeraden erstellen. Mit der Zusatzinformation der Fluoreszenzlebensdauer erhält man eine unabhängige Vergleichsgröße, so dass man wie für die NDA-Kalibriergeraden einen Korrekturfaktor verwenden kann. Die Experimente zeigen, dass die Verwendung von PP-Referenzen nicht unbedingt notwendig ist, sondern dass einfache Farbstofflösungen zur Kalibrierung bei zusätzlicher Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer ausreichen.



**Abbildung 64:** Konzentrationsverteilung primärer und sekundärer Amine auf der Oberseite einer plasma-aminiierten PP-Membran nach Umrechnung der Intensitäten über die Kalibriergeraden in Abbildung 63 und Verwendung eines Korrekturfaktors über die Fluoreszenzlebensdauer. Die Skala gibt die Konzentration in  $\mu\text{M}$  an. In der Mitte ist das Kompositbild mit der Skala nach Abbildung 61 zu sehen.



In Abbildung 64 ist eine orts aufgelöste Umrechnung von Intensitäten in Konzentrationen für primäre und sekundäre Amine gezeigt. Durch die Umrechnung sind im Kompositbild jetzt die tatsächlichen Verhältnisse von primären und sekundären Amine farbkodiert. Es ist zu erkennen, dass sich der untersuchte Bereich relativ gleichmäßig zu 70-80% aus primären und 20-30% Prozent aus sekundären Aminen zusammensetzt. An einigen Stellen der Porenwände ist das Verhältnis etwas zugunsten sekundärer Amine verschoben (Magenta Farbton). Bei der quantitativen Untersuchung ist die Relation von Pixelauflösung zu Mikroskopauflösung wichtig. Wird zum Beispiel eine Pixelauflösung von  $0.5\ \mu\text{m}$  gewählt, die laterale Mikroskopauflösung beträgt aber  $0.2\ \mu\text{m}$ , so wird beim Abrastern einer Fläche nicht die Fluoreszenz aus der gesamten Fläche detektiert. Auch wenn die Probe nicht Punkt für Punkt, sondern in einer Linie abgerastert wird, so bleiben dennoch freie Flächen zwischen den einzelnen Linien, aus denen keine Fluoreszenz detektiert wird. Ist hingegen die Pixelauflösung kleiner als die Mikroskopauflösung, so wird ein Teil der abgerasterten Fläche mehrfach detektiert, was zu falsch höheren Konzentration führen sollte. Ebenso verhält es sich mit dem z-Abstand zwischen den einzelnen Bildern. Man kann hierbei auch von Unterabtastung (*undersampling*) und Überabtastung (*oversampling*) sprechen.



**Abbildung 65:** Diskrepanz von Pixelauflösung (Kästchen) zu Mikroskopauflösung (roter Kreis) was zu *undersampling* oder *oversampling* führen kann.

Daher ist es wichtig, dass die Referenzproben mit genau denselben Scanparametern aufgenommen werden. Darüber hinaus spielt auch Photobleichen eine Rolle als systematischer Fehler, der zu kleine Werte liefern könnte. Bei den Referenzmessungen in Lösung spielt Photobleichen zumindest bei niederviskosen Lösungsmitteln keine Rolle, da hier durch Diffusionsprozesse schnell neue, nicht gebleichte Moleküle nachströmen können. Bei immobilisierten Farbstoffmolekülen auf der Substratoberfläche ist dieser Prozess unterbunden. Es ist besser, gegebenenfalls eine niedrigere Pixelauflösung als die Mikroskopauflösung zu wählen, um eine Überabtastung der Probe zu vermeiden.

Zur Vergleichbarkeit mit anderen Analysenmethoden, hier vor allem REM-EDX und ATR-FTIR ist eine entsprechende Umrechnung wichtig. Beide Methoden besitzen wie die Fluoreszenzmikroskopie eine bestimmte Messtiefe beziehungsweise axiale Auflösung, die

deutlich über der Behandlungstiefe des Polymers für kompakte Substrate liegt.[31] Daher wird bei einer Quantifizierung die Flächendichte der Aminogruppen erhalten. Bei der hier vorgestellten Methode zur Bestimmung absoluter Konzentration müsste streng genommen auch der Begriff der Dichte verwendet werden, da sich eine Konzentration auf ein Mengenanteil in einem Stoffgemisch bezieht.[172] Dies ist für die Referenzlösungen natürlich zutreffend, nicht aber unbedingt für die Polymerproben. Zur Umrechnung der Aminogruppenkonzentration in eine Aminogruppen-Flächendichte ist die axiale Auflösung des Mikroskops zu berücksichtigen. Soll die Aminogruppendichte auf das Substrat bezogen werden, so muss außerdem die Porosität berücksichtigt werden. Die Reindichte von PP beträgt  $0.9 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ , die Rohdichte der Membran nur  $0.23 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ . Darüber hinaus liegt die Behandlungstiefe für die PP-Membran deutlich über der Messtiefe; Abbildung 64 zeigt nur den Bereich maximaler Konzentration. Durch einen Tiefenscan kann damit die Aminogruppendichte einer PP-Membran entweder tiefenaufgelöst dargestellt werden oder durch Mittelung aller Signale und Multiplikation mit der Messtiefe die Gesamtflächendichte angegeben werden, abhängig davon, welche Werte von Interesse sind beziehungsweise verglichen werden sollen. Die verschiedenen Angaben für die Daten aus der in Abbildung 64 dargestellten Messung sind in Tabelle 6 gegenübergestellt.

**Tabelle 6:** Konzentrationen beziehungsweise Aminogruppen-Flächendichten einer PP-Membran Oberseite (Ausgangsspannung 6-6.3 kV, Behandlungszeit 3 s) mit Diskriminierung von primären und sekundären Aminen.

		NH <sub>2</sub>	NH	NH <sub>x</sub> gesamt
<b>c</b>	μM	165	55	220
<b>c<sub>porös</sub></b>	μM	642	215	857
<b>ρ<sub>max</sub></b>	nm <sup>-2</sup>	0.15	0.05	0.20
<b>ρ<sub>max,porös</sub></b>	nm <sup>-2</sup>	0.58	0.19	0.77
<b>ρ<sub>gesamt</sub></b>	nm <sup>-2</sup>	0.45	0.16	0.61
<b>ρ<sub>gesamt,porös</sub></b>	nm <sup>-2</sup>	1.77	0.64	2.41

Für ein plasmabehandelte BOPP-Folie berichten Klages *et al.* von einer primären Aminogruppendichte von circa  $10 \text{ nm}^{-2}$ . [31] Für PP-Membrane liegen noch keine Daten vor, diese werden aber in etwa in derselben Größenordnung liegen. Für die Methode des SEM-EDX mit chemischer Derivatisierung der Aminogruppen durch 4-(Trifluoromethyl)benzaldehyd sind höhere Werte als mit der fluoreszenzmikroskopischen Analyse zu erwarten, da die chemische Derivatisierung in der Gasphase erfolgt, das Fluoreszenzlabeling hingegen nasschemisch. Während bei der Gasphasenderivatisierung das LMWOM auf der Folie haften bleibt, wird es durch die nasschemische Derivatisierung abgewaschen. Zur direkten Ver-

gleichbarkeit der Methoden müssen die Proben eine vergleichbare Nachbehandlung erfahren. Dennoch zeigt sich durch das Einzelergebnis bereits die richtige Tendenz und Größenordnung. Daher kann die absolute Bestimmung der Aminogruppendichte über Fluoreszenzmikroskopie zusätzlich zu den bereits etablierten Methoden herangezogen werden.

## 4.2 Charakterisierung von Hydrogelen mittels Sensormolekülen

Entscheidend für die Charakterisierung von Hydrogelen durch fluoreszenzmikroskopische Methoden ist die Wahl des molekularen Sensors. Hierzu stehen verschiedene Klassen von Fluorophoren zur Auswahl. Laser- beziehungsweise Labelfarbstoffe aus der Klasse der Rhodamine und Cumarine zeichnen sich durch zum Teil hohe Absorptionsquerschnitte, Quantenausbeuten und Photostabilität aus. Sie sind preiswert und intensiv untersucht worden. Daher wurden erste Messungen an Hydrogelen mit Rhodamin 6G und Cumarin 314 durchgeführt. Der große Nachteil ist jedoch die sehr geringe Molekulargröße unter 1 kDa. Dadurch lassen sich aus erzielten Ergebnissen nicht unbedingt Rückschlüsse auf das Verhalten von hochmolekularen Proteinen in Hydrogelen schließen. Durch Konjugation der Farbstoffe an Dextrane kann diesem Problem Abhilfe geschaffen werden. Dextrane sind hochmolekulare, verzweigte Polysaccharide, die aus Bakterien gewonnen werden können und eine knäuelartige Struktur besitzen. Sie sind in unterschiedlichen Größen bis zu einigen MDa Molmasse erhältlich. Damit besitzen die Farbstoff-Dextrane sehr ähnliche Größen wie die Zielproteine. Allerdings ist die Dextran-Hydrogel-Wechselwirkung nicht mit einer Protein-Hydrogel Wechselwirkung vergleichbar. So besitzen viele Proteine zum Beispiel mehrfache lokalisierte Ladungen. Gerade bei der Fülle und Komplexität an verschiedenen Wechselwirkungen im Polymernetzwerk wären somit Ergebnisse nur eingeschränkt übertragbar. Problematisch ist außerdem für Anisotropieuntersuchungen die lokale Rotation des Fluorophors. Da die Farbstoffe über Einfachbindungen an das Dextran gebunden sind, ist eine freie Rotation von außen liegenden fluorophoren Gruppen möglich (siehe auch Gleichung (2-29)).[74,173] Dadurch ergibt sich eine komplexere Auswertung der Anisotropieabklingkurven und verringerte Sensitivität für die globale Rotation des Dextrans. Darüber hinaus ist nicht geklärt, wie viele Fluorophore sich in welcher lokalen Umgebung befinden, so dass von mehreren Zuständen ausgegangen werden muss, was im schlimmsten Fall in einer Verteilung von Rotationskorrelationszeiten resultieren würde. Das gleiche Problem ergibt sich, wenn Zielproteine mit Farbstoffen fluoreszenzmarkiert werden. Neuartige Fluorophore wie Quantenpunkte besitzen hohe Quantenausbeuten und hervorragende Photostabilität sowie eine vergleichbare Größe. Die Fluoreszenzpolarisation ist aber weitaus komplizierter als für lineare Emissionsdipole von organischen Fluorophoren, so dass das Anisotropiemodell aus Kapi-

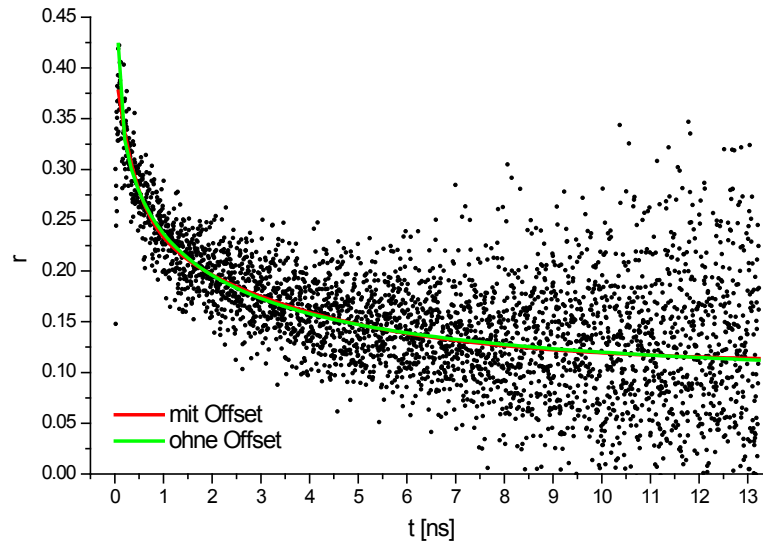
tel 2.4 erweitert werden muss. Das Thema ist Gegenstand aktueller Forschung,[174–176] so dass in dieser Arbeit Quantenpunkte vorerst für Anisotropiemessungen in Hydrogelen ausscheiden. Außerdem stellt sich auch hier die Frage der vergleichbaren Wechselwirkung. Am besten geeignet für Fluoreszenzanisotropieuntersuchungen ist die Klasse der fluoreszierenden Proteine beziehungsweise Leuchtproteine, als Sammelbegriff auch VFP bezeichnet (*visible fluorescent proteins*, als Abgrenzung zur UV-Autofluoreszenz einiger Aminosäuren). Da ihre fluorophore Gruppe im Inneren fest in die Proteinstruktur eingebunden ist, tritt fast keine lokale Rotation auf. Die Wechselwirkungen mit dem Hydrogel werden sehr ähnlich zu denen der Zielproteine sein. Ein Nachteil ist die relativ kleine Größe. Während ein VFP typischerweise um 27 kDa groß ist, ist zum Beispiel ein IgG-Antikörper bereits 144 kDa groß.

Aufgrund der aufgezählten Vor- und Nachteile sind die ersten Untersuchungen an Hydrogelen mit den niedermolekularen Farbstoffen erfolgt. Es hat sich relativ schnell herausgestellt, dass Rhodamin 6G als ionischer Farbstoff ungeeignet ist. Vermutlich spielen Adsorptionseffekte hierbei eine große Rolle. Daher konzentrieren sich die Messungen auf Cumarin 314 als Farbstoff. Anschließend wurde zu den grün fluoreszierenden Proteinen mTagGFP und TurboGFP übergegangen.

#### **4.2.1 Fluoreszenzanisotropie-Messungen**

##### **4.2.1.1 Cumarin 314**

Cumarin 314 ist ein ungeladenes, fast planares Molekül mit Dimensionen von circa  $5 \times 10 \text{ \AA}^2$  und einer Molekularmasse von 313 Da. Nach dem derzeitigen Wissen dürfte das Molekül damit viel kleiner sein als die Durchmesser der Maschen (Quervernetzungen) im Polymernetzwerk. Nichtsdestotrotz wird das Molekül in Wechselwirkung mit dem Polymer im Hydrogel treten. Die Untersuchungen decken unterschiedliche Belichtungszeiten für die Quervernetzung, unterschiedliche Polymerkonzentration, unterschiedliche Quervernetzerlängen sowie den Vergleich mit unvernetzter Polymerlösung und Wasser ab. Alle Messungen wurden an mehreren Stellen im Hydrogel und mehreren hergestellten Gelscheiben vorgenommen. Die Daten sind mit maximaler Zeitauflösung von 4 ps aufgenommen und durch eine biexponentielle Funktion angepasst. Eine Anisotropieabklingkurve ist exemplarisch in Abbildung 66 zu finden.



**Abbildung 66:** Anisotropieabklingkurve für ein 20%iges HES-P(EG)<sub>6</sub>MA, DS 0.085 Hydrogel mit I2959 20 min quervernetzt und Cumarin 314 als Sensormolekül. Die farbigen Linien sind jeweils Ergebnis einer biexponentiellen Funktionsanpassung.

Aus den Einzelergebnissen der Funktionsanpassung sind gewichtete Mittelwerte nach Gleichung (3-12) und (3-13) gebildet worden und in Tabelle 7 zusammengefasst.

**Tabelle 7:** Zusammenfassung der Untersuchungen des Anisotropieverhaltens von Cumarin 314 in HES-P(EG)<sub>6</sub>MA, DS 0.085 Hydrogelen mit I2959 quervernetzt. Die Prozentzahl gibt den Massenanteil vom Polymer im Hydrogel an, die Zeitangabe die Dauer der Bestrahlung. „L“ steht für langen Spacer, das heißt P(EG)<sub>10</sub>MA mit einem DS von 0.088, Lsg. steht für Lösung. Das Symbol  $\pm$  steht für die einfache Standardabweichung und wird auch in allen zukünftigen Tabellen verwendet. (‡) Für die Messung in Wasser wurde bei der Funktionsanpassung kein Offset zugelassen.

	$g_1$	$\pm$	$\theta_1$	$\pm$	$g_2$	$\pm$	$\theta_2$	$\pm$	$g_\infty$	$\pm$	$r_0$	$\pm$
	%		ns		%		ns		%			
<b>10% 20 min</b>	30	38	0.15	0.08	47	27	1.27	1.82	23	38	0.226	0.116
<b>10% 40 min</b>	22	17	0.27	0.13	36	12	3.47	0.73	42	17	0.319	0.073
<b>20% 20 min</b>	32	19	0.19	0.15	41	14	2.01	1.89	28	27	0.342	0.105
<b>10%L 20 min</b>	32	8	0.33	0.10	35	6	2.76	0.64	33	12	0.366	0.049
<b>10% Lsg.</b>	51	1	0.30	0.01	36	1	2.3	0.05	12	1	0.325	0.004
<b>H<sub>2</sub>O</b>	100	-	0.16	0.01	-	-	-	-	0‡	-	0.224	0.002

Das auffälligste Merkmal ist die Multiexponentialität des Anisotropiezerfalls, das heißt es liegen verschiedene Mikroumgebungen beziehungsweise verschiedene Populationen des Moleküls vor. Eine kurze Rotationskorrelationszeit liegt im Bereich der Rotationskorrelationszeit von Cumarin 314 in Wasser, die lange ist bei circa 2 ns zu finden. Allerdings lassen sich keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Hydrogelen herausarbeiten; sie alle ähneln außerdem dem Verhalten von Cumarin 314 in unvernetzter Polymerlösung. Daher spielt die Stärke und Art der Quervernetzung keine Rolle für die Wechselwirkung von

Cumarin mit dem Polymer. Ein Teil des Cumarins scheint in Wechselwirkung mit dem Polymer zu stehen, der andere Teil im Wesentlichen nur von Wasser umgeben zu sein. Widersprüchlich ist dahingehend aber, dass der Anteil der langen Rotationskorrelationszeit für ein 20%iges Hydrogel nicht größer ist als für ein 10%iges Hydrogel. Diskussionsbedarf besteht auch zum Auftreten einer residualen Anisotropie,  $g_\infty$  genannt. Dies ist eine Komponente mit sehr langer, nicht auflösbarer Rotationskorrelationszeit, bedingt durch eine starke gehinderte Rotationsdiffusion des Moleküls. Letztendlich ist es bei nicht eindeutiger Datenlage eine Frage der Definition, ob man bei der Funktionsanpassung einen Offset zulässt oder nicht. Arbeitet man ohne Gerätefaktor, kann sich ein solcher Offset als systematischer Fehler einschleichen. Hier ist dies jedoch nicht der Fall, und auch qualitativ ist in Abbildung 66 trotz stark verrauschter Daten zu erkennen, dass sich die Anisotropieabklingkurve nicht Null annähert. Andererseits könnte es sich auch um eine sehr lange Rotationskorrelationszeit  $\theta_2$  handeln, die durch das schlechte Signal-Rausch-Verhältnis und das nicht ausreichend lange Messfenster von 13 ns nicht auflösen lässt. Setzt man den Offset mit Null fest, so ergeben sich Rotationskorrelationszeiten von circa 1 ns und 30 ns, bei fast gleicher Gütezahl  $\chi^2$  und Korrelationskoeffizienten  $R^2$ .<sup>\*</sup> Letztendlich lässt sich mit den vorhandenen Daten nicht klären, welche dieser Interpretationen wahrscheinlicher ist. Aus physikalisch-chemischer Sicht lässt sich keine von beiden komplett ausschließen.

Um diese Diskussion zu umgehen, kann man als Alternative auch das Konzept der gestreckten Exponentialfunktion anwenden (*stretched exponential*).<sup>[177]</sup> Anstelle von diskreten Zuständen geht man von einer Verteilung von Fluoreszenzlebensdauern aus, was bei Untersuchungen von Polymeren eine durchaus sinnvolle Annahme ist.

$$I(t) = \int_0^\infty e^{-\frac{t}{\tau}} \cdot \rho(\tau) d\tau \quad (4-7)$$

Dabei ist  $\rho(\tau)$  die Verteilungsfunktion der Lebensdauern. Aus einer multiexponentiellen Funktionsanpassung wird dann eine monoexponentielle mit einem Heterogenitätsparameter  $h$ .

$$I(t) = I_0 \exp \left[ - \left( \frac{t}{\tau} \right)^{\frac{1}{h}} \right] \quad (4-8)$$

Der Heterogenitätsparameter hat allerdings keine direkte physikalische Bedeutung, sondern ist nur ein Maß für die Breite der Verteilung. Die errechnete Lebensdauer ist als eine

---

<sup>\*</sup> siehe hierzu auch die Diskussion in Kapitel 4.2.1.2

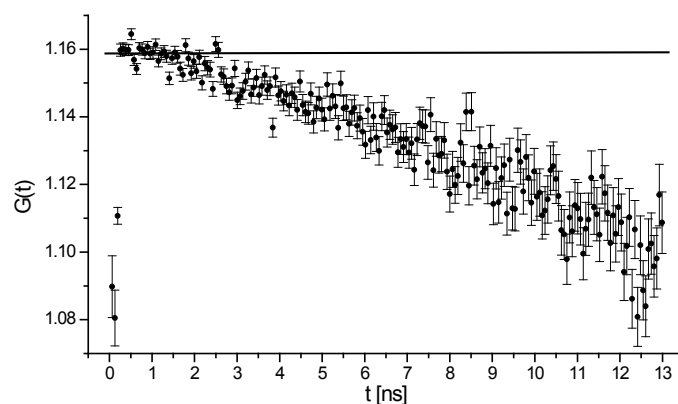
Art Mittelwert der Verteilung zu betrachten. Exemplarisch auf eine Hydrogel-Messung angewendet ergibt sich eine Lebensdauer von 1.4 ns und als  $h$ -Parameter 2.1 mit Offset beziehungsweise 2.7 ns und 3.4 ohne Offset.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Verwendung von Cumarin 314 als Sensor-molekül zur Charakterisierung von Hydrogelen sich als ungeeignet erweist, da das Fluoreszenzdepolarisationsverhalten keine Sensitivität gegenüber Gelparametern zeigt. Es ist nicht zu erwarten, dass sich die hier erzielten Ergebnisse auf Proteine als Zielmoleküle übertragen lassen. Daher konzentrieren sich weitere Anisotropieuntersuchungen auf die GFP-Varianten.

#### 4.2.1.2 GFP-Mutanten

##### *Voruntersuchungen*

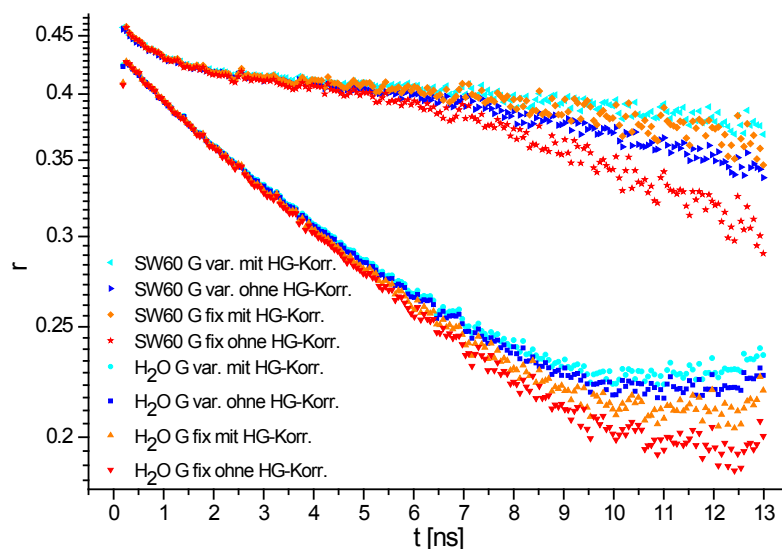
Ein bei den GFP-Messungen beobachtetes Phänomen ist die nicht zeitliche Konstanz des Gerätefaktors. Allgemein gehalten kann der G-Faktor prinzipiell von jeder Messvariable abhängen, das heißt  $G = f(x, y, z, t, \lambda, C)$ . Für eine Punktdetektion wie beim TCSPC-System ist keine Ortsabhängigkeit zu erwarten. Auch eine Zeitabhängigkeit in Relation zum Laserpuls ist, wie bereits in Kapitel 3.8 erwähnt, aus physikalischer Sicht nicht zu erwarten. Eine Wellenlängenabhängigkeit ist durch die Transmission und Reflektion der beiden Fluoreszenzpolarisationen im polarisierenden Strahlteilerwürfel gegeben. Der Parameter  $C$  beinhaltet alle weiteren geräteseitigen Faktoren, die zum Beispiel durch unterschiedliche optische Wege oder die Justierung der Detektoren gegeben sind. Daher ist bei fester Detektionswellenlänge zu erwarten, dass  $G(t) = \text{const.}$  ist. Abbildung 67 zeigt den errechneten Verlauf des Gerätefaktors diskret für jeden Datenpunkt.



**Abbildung 67:** Exemplarischer Verlauf des G-Faktors für eine Datenreihe.

Der zeitliche Verlauf des Gerätefaktors zeigt eine eindeutige Nichtkonstanz, obwohl aus physikalischer Sicht keine Zeitabhängigkeit zu erwarten ist. Nun könnte der G-Faktor zur

Berechnung der Fluoreszenzanisotropie nach Gleichung (3-2) auch konstant gesetzt werden mittels Auswahl von Intensitätsdatenpunkten kurz nach dem Laserpuls, da diese aufgrund der hohen Fluoreszenzintensität am zuverlässigsten sind. Der Einfluss auf die Anisotropieabklingkurve wird in Abbildung 68 dargestellt.

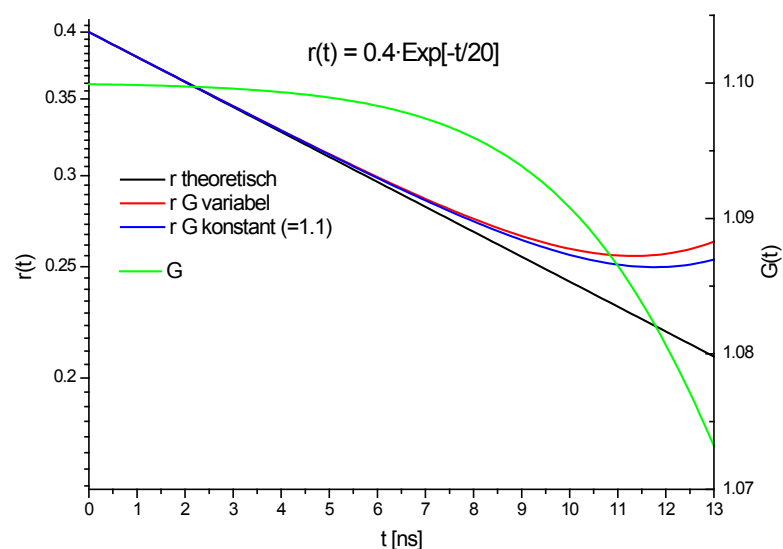


**Abbildung 68:** Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzanisotropie für GFP in Wasser (untere vier Kurven) sowie in 60 wt% Saccharoselösung. Für beide Datenreihen wird die Fluoreszenzanisotropie mit vier unterschiedlichen Ansätzen errechnet: der G-Faktor ist zeitlich variabel oder fix und es wird eine Hintergrundkorrektur durchgeführt oder nicht (siehe Text).

In Abbildung 68 werden vier Optionen gezeigt und für zwei Proben gegenübergestellt. Es ist einerseits möglich, den G-Faktor für jeden Zeitkanal einzeln zu berechnen oder als konstant während des Pulszyklus anzusehen, was zunächst einmal physikalisch sinnvoll erscheint. Dazu wird ein arithmetisches Mittel von Zeitkanälen kurz nach dem Laserpuls und daher hoher Intensität und kleinem Fehler gebildet und die Unsicherheit für  $r$  und  $F$  nach Gleichungen (3-10) und (3-11) bestimmt. Daneben wird auch eine Hintergrundkorrektur einen Einfluss auf die errechneten Intensitäts- und Anisotropiekurven zeigen. Hierbei werden bei ausgeschaltetem Laser Detektorrauschen und Hintergrundlicht abgezogen, wobei der zweite Faktor den wesentlichen Beitrag liefert. Deshalb wird für die beiden G-Faktor-Berechnungen noch zwischen mit oder ohne Hintergrundkorrektur unterschieden. In der halblogarithmischen Darstellung in Abbildung 68 würde man sowohl für GFP in Wasser, als auch in hochviskoser Saccharoselösung einen monoexponentiellen Anisotropiezerfall und damit eine Gerade erwarten. (Details hierzu und die Erklärung der schnellen Komponente für die Kurven in Saccharoselösung werden später in diesem Kapitel erörtert und sind an dieser Stelle nicht relevant.) Für GFP in Wasser ergibt sich die geringste Abweichung vom idealen Kurvenverlauf für einen konstanten G-Faktor ohne Hintergrundkorrektur und die stärkste Abweichung für einen zeitvariablen G-Faktor mit Hintergrundkorrektur. Für die Saccharoselösung



verhält es sich hingegen genau andersherum, so dass keine Aussage getroffen werden kann, welche Methode die zuverlässigsten Ergebnisse liefert. Eine Kurvensimulation mit dem Programm Wolfram Mathematica 7 hat gezeigt, dass für den anomalen Kurvenverlauf der Anisotropiekurven wahrscheinlich ein weiterer Beitrag zum Hintergrundsignal verantwortlich ist. Dazu wurden synthetische Intensitätsabklingkurven nach Gleichung (2-32) mit für GFP-Messungen typischen Werten erzeugt und jeweils ein konstanter Hintergrund für die Kanäle addiert. Aus diesen Daten wurde der G-Faktor nach Gleichung (3-3) sowie die damit experimentell errechnete Fluoreszenzanisotropie nach Gleichung (3-2) erzeugt und mit dem erwarteten Kurvenverlauf der Fluoreszenzanisotropie verglichen.

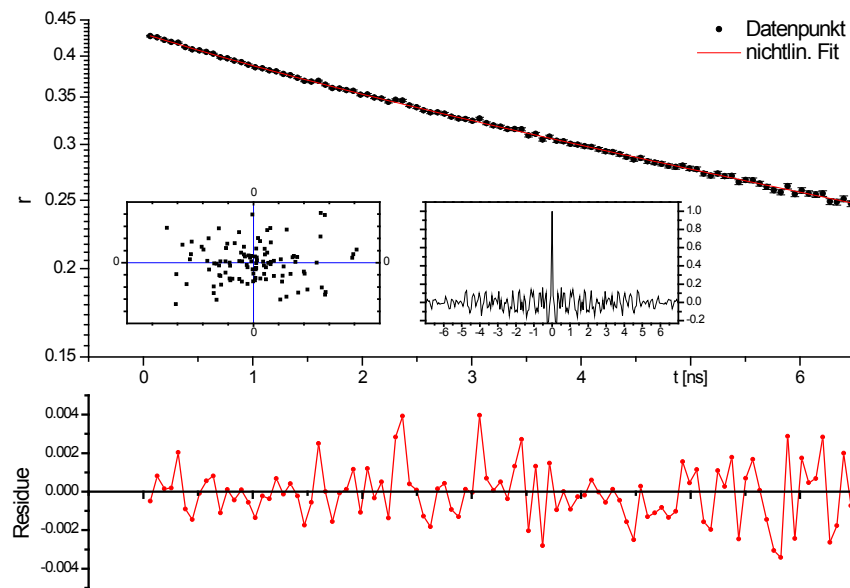


**Abbildung 69:** Vergleich einer simulierten Anisotropieabklingkurve ohne künstlichen Hintergrund (schwarz) und künstlichem, additiven Hintergrund. Die grüne Kurve zeigt den zeitlichen Verlauf des G-Faktors; die rote und blaue Kurve zeigen den Anisotropieverlauf mit variablem oder konstant gesetztem G-Faktor.

Es zeigt sich, dass durch den Hintergrundbeitrag, der in dem gezeigten Beispiel weniger als 1% der Anfangsamplituden der Intensitätskanäle betrifft, einen deutlichen Einfluss auf den Verlauf der Anisotropiekurve besitzt. Der Einfluss einer konstanten Hintergrundkomponente steigt mit zunehmender Zeitdauer relativ zum Laserpuls, da die Fluoreszenz exponentiell abklingt; bei einer mittleren Fluoreszenzlebensdauer für GFP von 2,5 ns beträgt die Fluoreszenzintensität nach 12,5 ns nur  $\frac{1}{e^5} \approx 0,7\%$ . Dass bei Vergleichsmessungen von zum Beispiel Rhodamin 6G in Glykol mit ähnlicher Fluoreszenzlebensdauer der berechnete G-Faktor zeitlich konstant ist und die Fluoreszenzanisotropiekurve den erwarteten Verlauf zeigt, spricht dafür, dass der nicht berücksichtigte Hintergrundbeitrag mit der Art des Fluorophors zu tun haben muss. Die zeitliche Nichtkonstanz ist sowohl in allen homogenen Lösungen, als auch in den Hydrogelen gleichermaßen zu beobachten. Es wird vermutet, dass aufgrund der Größe der Proteine Streueffekte durch den Laser auftreten können, die beim Vermessen von Farbstoffen mit kleinem Molekulargewicht wie zum Beispiel den genannten Rhodamin 6G

nicht auftreten oder nur eine verschwindend kleine Rolle spielen. Diese werden bei der Bestimmung des Hintergrundes bei ausgeschaltetem Laser nicht berücksichtigt. Um diesen Beitrag bestimmen zu können, müsste bei identischem Aufbau die Fluoreszenz des GFP komplett geblockt werden, um selektiv diesen Hintergrundbeitrag zu detektieren und damit vom eigentlichen Messsignal subtrahieren zu können. Ein anderer Ansatz könnte über eine Fitroutine gehen, die den Hintergrundbeitrag numerisch bestimmt. Als Konvergenzkriterium würde die zeitliche Konstanz des G-Faktors dienen. In dieser Arbeit konnte diese Problematik noch nicht abschließend gelöst werden, so dass wie beschrieben mit einem konstanten G-Faktor unter Subtraktion der beschriebenen Hintergrundbeiträge gerechnet wird. Aufgrund Verfälschung der Anisotropiekurven durch den nicht subtrahierten Hintergrundbeitrag werden bei der Funktionsanpassung nur die Datenpunkte vom Puls bis circa 7 ns verwendet, da bis zu diesem Zeitpunkt der Einfluss durch den unbekannten Hintergrundbeitrag gering ist. Dies führt vor allem bei langsamer Fluoreszenzdepolarisation zu Präzisionsverlusten bei der Bestimmung der Rotationskorrelationszeit.

Die erhaltenen Datenpunkte für  $r$  werden einer biexponentiellen Funktionsanpassung unterzogen (siehe Kapitel 3.8). Während das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  und die Anpassungsgüte  $\chi^2$  bereits zwei quantitative Kriterien zur Beurteilung von Funktionsanpassungen sind, so gehört zu einer vollständigen Analyse die Betrachtung der Residuen, die die Differenz zwischen einem beobachteten Wert und dem vorhergesagten Wert sind. Hat man eine passende Modellgleichung erfolgreich an die Daten angepasst, so sollten die Residuen zufällig um Null fluktuieren. Da es manchmal schwierig ist, dieses rein mit Augenmaß zu beurteilen, gibt es noch modifizierte Darstellungen zur Residuenanalyse (Abbildung 70). Erwähnenswert sind die Autokorrelationsfunktion der Residuen, die nach einem scharfen Abfall von  $t = 0$  aus um Null fluktuieren sollte und der *lag plot*, bei dem Residue  $i$  gegen  $(i-1)$  aufgetragen wird und sich bei unkorrelierten Residuen die Punkte symmetrisch um den Ursprung  $(0|0)$  häufen sollten. Beide Residuenanalysen eignen sich, um zeitliche Beziehungen zwischen Datenpunkten darzustellen.



**Abbildung 70:** Exponentieller Fit einer Anisotropieabklingkurve mit Residuenanalyse. Unten: absolute Residuen; kleiner Graph links: *lag plot* der Residue; kleiner Graph rechts: normalisierte Autokorrelation der absoluten Residuen.

Ein wichtiger Faktor ist bei der Funktionsanpassung, ob ein Offset zugelassen werden soll oder nicht. Physikalisch entspricht der Offset einer residualen Anisotropie  $r_{\infty}$  (siehe auch Abschnitt über Cumarin 314 Hydrogele). Da die Fluoreszenzdepolarisation sehr langsam verläuft und das Messfenster nur 13 ns beträgt, ist die Anisotropie am Ende des Pulszyklus weder auf Null abgeklungen, noch lässt der Kurvenverlauf ein asymptotisches Abflachen gegen einen Wert größer Null erahnen, da das Signalrauschen zum Ende des Pulszyklus zunimmt. Einen objektiven Aufschluss kann ein Vergleich der Fitresultate mit variablem Offset und fixem Offset gleich Null geben. Zu erwarten ist, dass eine Funktionsanpassung mit mehr Parametern immer das bessere Ergebnis liefert, da mehr Parameter auch mehr Freiheitsgrade bei der Funktionsanpassung bedeuten. Ein F-Test (Gleichung (4-9)) kann dann darüber Aufschluss geben, ob die Verbesserung auch signifikant ist.<sup>\*</sup> Dabei ist  $p$  die Anzahl der Parameter der Fitfunktion und  $n$  die Anzahl der Datenpunkte.

<sup>\*</sup> Ein F-Test ergibt nur sinnvolle Resultate, wenn eine Fitgleichung eine Untermenge der anderen Gleichung ist, so wie es für eine mono- und biexponentielle Funktion der Fall ist. Für einen uneingeschränkten Vergleich kann das Akaike-Informationskriterium verwendet werden.[178]

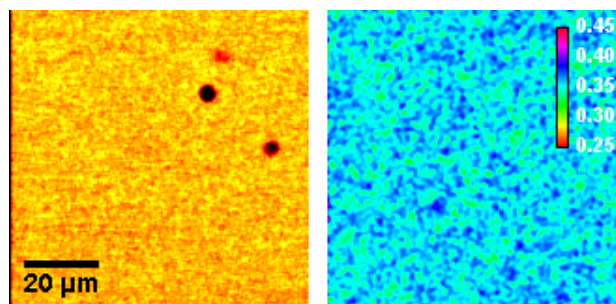
**Tabelle 8:** Exemplarische Gütezahlen für eine biexponentielle Funktionsanpassung mit oder ohne variablen Offset an mTagGFP Anisotropiekurven.

	$y_0 \triangleq r_\infty$	$t_2 \triangleq \theta_2$	$\pm$	$\chi^2_{\text{red}}$	$\overline{R}^2$
	ns				
<b>20% Gel</b>	0	31.0	0.4	1.397	0.9977
	var.	15.5	3.1	1.348	0.9978
<b>H<sub>2</sub>O</b>	0	14.0	0.5	0.991	0.9992
	var.	8.2	0.8	0.968	0.9993

$$F = \left( \frac{\chi^2_{\text{red},1} - \chi^2_{\text{red},2}}{p_2 - p_1} \right) \div \left( \frac{\chi^2_{\text{red},2}}{n - p_2} \right) \quad (4-9)$$

Exemplarisch an den in Tabelle 8 gezeigten Daten ergibt die Funktionsanpassung mit variablem Offset nur eine minimale Verbesserung des  $\chi^2$ -Wertes (also der Fehlerquadratsumme). Für die Hydrogelkurve ist der F-Wert nach Gleichung (4-9) 3.95 (mit  $p_1 = 4$ ,  $p_2 = 5$ ,  $n = 114$ ) und ist damit deutlich größer als der kritische Wert  $F(0.05, 100, 100) = 1.39$ , so dass in diesem Fall keine signifikante Verbesserung des Fitresultats vorliegt. Neben der reinen Statistik ist ein fast wichtigeres Argument gegen den variablen Offset, dass im Vergleich zu Literaturwerten zu kurze Rotationskorrelationszeiten gefunden werden (zum Beispiel 8.2 statt 14.0 ns für mTagGFP in Wasser). Problematisch bleibt die Festlegung des Offsets aber trotzdem, da nicht mit hoher Sicherheit bewiesen werden kann, ob die gemachte Annahme auch wirklich zulässig ist. Solange aber die Festlegung konsequent für alle vermessenen Proben gilt, ist eine Vergleichbarkeit der Proben untereinander unproblematisch.

Eine wichtige Untersuchung ist, die Homogenität der hergestellten Hydrogele durch Darstellung der stationären Fluoreszenzanisotropie nach Gleichung (4-5) zu überprüfen. Die Anisotropiekurve werden aus der zeitaufgelösten Intensität über eine Fläche  $80 \times 80 \mu\text{m}^2$  integriert. Dies ermöglicht im Gegensatz zur Punktdetektion zum einen die Aufnahme des Signals bei minimalem Bleichen und zum anderen gewährleistet die Integration, dass lokale Inhomogenitäten nicht überbewertet werden.



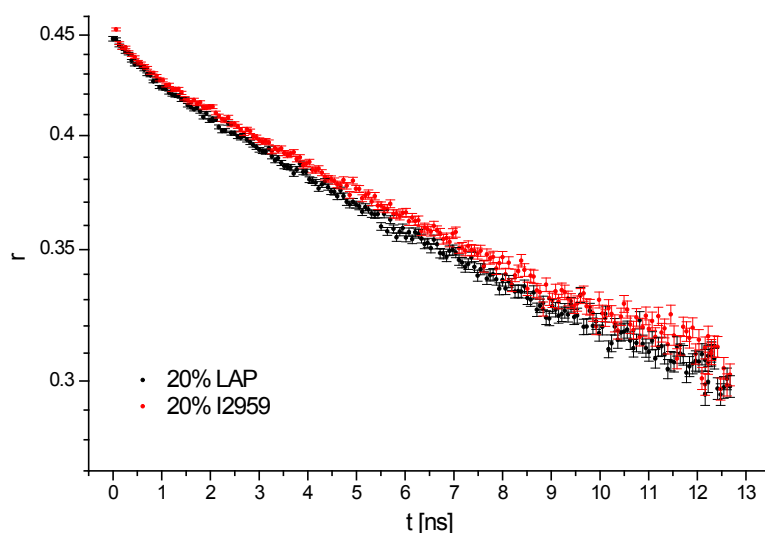
**Abbildung 71:** Darstellung der integralen Intensität (links) und stationären Anisotropie (rechts) eines 20%igen HES-P(EG)<sub>6</sub>MA/DS0.048 Hydrogels mit den in Abbildung 30 gezeigten Falschfarbenskalen. Da die pixelweise Darstellung der Anisotropie stark verrauscht ist, wurde ein Gaußfilter ( $\sigma = 1$  Pixel) über das Bild gelegt.

Die in Abbildung 71 gezeigte Messung wurde dahingehend gewählt, als dass bei ihr Inhomogenitäten in der Fluoreszenzintensität auftreten. Wahrscheinlich ist dies einer nicht vollständigen Auflösung des Polymers zuzuschreiben. Daraus ergeben sich jedoch keine Abweichungen in der Anisotropie. Werden solche Bereiche vom Benutzer erkannt, können diese auch bei der Integration des Signals durch Wahl einer ROI (*region of interest*) unberücksichtigt bleiben. Die Verteilung der stationären Anisotropie ist normalverteilt mit einem Mittelwert und einer Standardabweichung für das geglättete Bild von  $\langle \bar{r} \rangle = 0.35 \pm 0.01$ . Es ist spekulativ, dass eine Struktur in der örtlich aufgelösten Fluoreszenzanisotropie zu erkennen ist. Da aus den Intensitätsdaten keine Mikrostrukturierung erkannt werden kann und die Verteilung unimodal ist, ist diese Behauptung nicht ohne detailliertere Untersuchungen belegbar. Daher wird von einer homogenen Fluoreszenzanisotropieverteilung im Hydrogel ausgegangen.

### *mTagGFP*

Die erste Fragestellung, die sich ergeben hat, ist die Vergleichbarkeit von Hydrogelen mit gleichen Polymerparametern (HES-P(EG)<sub>6</sub>MA, DS 0.048), aber unterschiedlichen Initiatoren. Gerade in Hinsicht auf die Biokompatibilität ist eine möglichst geringe benötigte Konzentration an Initiator wünschenswert. Während erste Untersuchungen mit dem etablierten Initiator Irgacure 2959 durchgeführt wurden, wurde später auf LAP umgestellt. Die hier geringere einzusetzende Konzentration (0.01 wt% gegenüber 0.015 wt%) mag sich vor allem durch den besseren Absorptionsquerschnitt für die 366 nm Linie einer UV-Lampe begründen. Da eine wichtige Zielsetzung des Hydrogels als Drug Delivery System ist, empfindliche Proteine zu schützen, muss bei der Bestrahlung mit UV-Licht natürlich eine mögliche Schädigung des Proteins in Betracht gezogen werden. Neben der Strahlungsintensität spielen vor allem die verwendete Wellenlänge und Bestrahlungsdauer eine Rolle. Mit LAP ist eine Initiierung sogar mit 405 nm durchführbar.[139] Durch die Messung der Fluoreszenzanisotropie

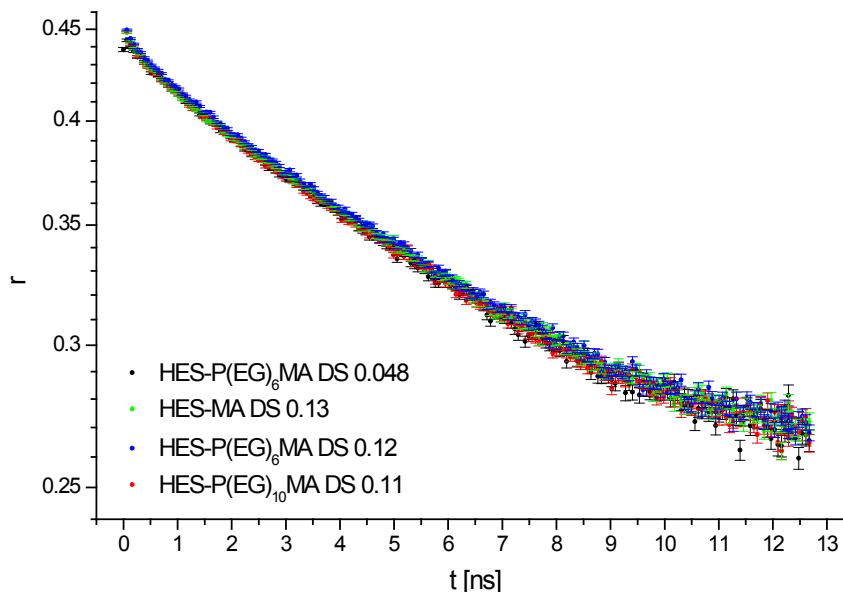
kann wie in Abbildung 72 ersichtlich gleiches Rotationsdiffusionsverhalten des GFP im Hydrogel für beide Initiatoren gezeigt werden.



**Abbildung 72:** Anisotropieabklingkurven von rmTagGFP in zwei Hydrogelen mit gleichen Gelparametern (HES-P(EG)<sub>6</sub>MA/DS0.048), aber verschiedenen Polymerisationsinitiatoren.

Die beiden Kurven liegen innerhalb des Bereiches der Bestimmungsunsicherheit und sind somit nicht unterscheidbar. Allerdings ist einschränkend zu sagen, dass das Translationsdiffusionsverhalten sich trotzdem unterscheiden kann. Eine FRAP-Messung der beiden Gele steht allerdings noch aus.

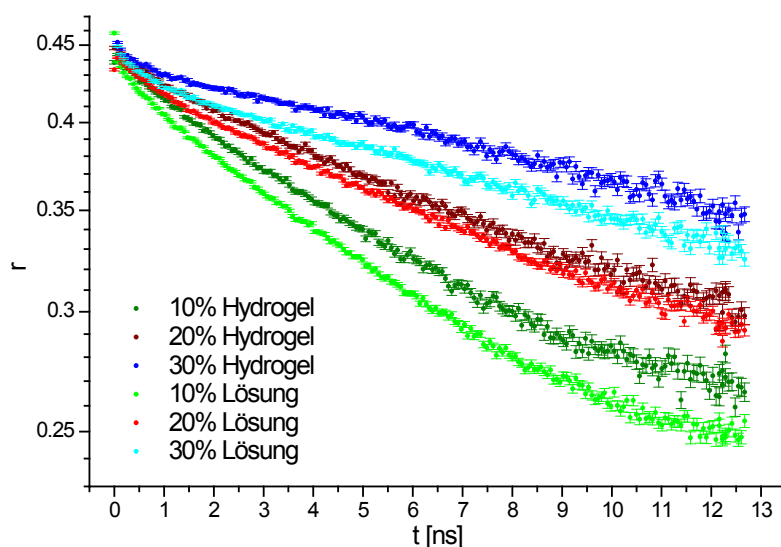
Interessanter ist allerdings die Variation des Polymers. Hydroxyethylstärke ist als Polymerrückgrat invariabel, aber an der Art der Quervernetzung lassen sich Parameter variieren. Zum einen kann bei der Synthese der Polymere der Substitutionsgrad (DS) variiert werden. Zum anderen ist die Länge des Quervernetzers über die Anzahl der Ethylenglykoleinheiten (*spacer*) variierbar. Ein höherer DS würde kleinere beziehungsweise engere Maschen im Gel bedeuten, genauso eine kürzere Quervernetzung. Es wurden zwei Hydrogele mit gleicher Spacerlänge, hier sechs Ethylenglykoleinheiten, hergestellt, dabei hat eines der Polymere einen circa doppelt so hohen Substitutionsgrad. Im selben Zug werden drei Hydrogele mit in etwa gleichem DS, aber mit keiner, sechs und zehn Glykoleinheiten miteinander verglichen.



**Abbildung 73:** Anisotropieabklingkurven von mTagGFP in Hydrogelen mit unterschiedlich langen Seitenketten und Substitutionsgraden, aber gleicher Polymerkonzentration von 10% im Hydrogel und LAP als Initiator.

Aus Abbildung 73 ist deutlich ersichtlich, dass sich alle vier Hydrogele bezüglich der Rotationsdiffusion des GFP im Gel nicht unterscheiden. Daraus lässt sich ableiten, dass die Art und Anzahl der Quervernetzung keinen Einfluss auf die Rotationsdiffusion zeigt oder die Unterschiede zu gering sind, um eine Auswirkung zu haben. Allerdings ist der Unterschied zwischen keiner und zehn Glykoleinheiten auf molekularer Ebene schon als deutlich zu bezeichnen. Nach einer einfachen Geometrieoptimierung mit einer Kraftfeldmethode ergibt sich eine lineare Länge von gut 37 Å; wt-GFP besitzt eine zylinderartige Form mit einer Dimension von 24 Å Durchmesser und 42 Å Länge.[72] Es ist aber kaum zu vermuten, dass die Glykoleinheiten linear zwischen dem Stärkerückgrat vorzufinden sind, da diese aus freidrehbaren Einzelbindungen bestehen. Wahrscheinlich wird eher eine gekrümmte bis knäuelartige, nicht statische Konformation vorliegen. Darüber hinaus spielt die Vielzahl an möglichen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Glucoseeinheiten einzelner linearer Stränge und zwischen den Glucoseeinheiten und den Glykoleinheiten eine wichtige Rolle. Die Messungen unterstreichen daher die These, dass die Art der Quervernetzung nur wenig bis keinen Einfluss auf das Rotationsverhalten des Proteins im Gel hat.

Ein wichtiger zu untersuchender Faktor ist auch die Polymerkonzentration im Hydrogel. Während Gele mit sehr niedriger Polymerkonzentration keine Formstabilität besitzen und auch leicht zerfließen können, werden Gele mit sehr hoher Polymerkonzentration spröde und eher glasartig. Aus vorherigen Untersuchungen hat sich ergeben, dass eine Polymerkonzentration zwischen 10 und 30% praktikabel ist.



**Abbildung 74:** Vergleich der Anisotropieabklingkurven von rmTagGFP in vernetzten und unvernetzten Polymeren unterschiedlicher Polymerkonzentration für HES-P(EG)<sub>6</sub>MA/DS0.048 mit LAP als Initiator.

Das für die in Abbildung 74 gezeigten Messungen verwendete Polymer ist in allen Fällen HES-P(EG)<sub>6</sub>MA mit einem DS von 0.048. Die Hydrogele unterschiedlicher Polymerkonzentration werden alle mit LAP als Initiator quervernetzt. Die unvernetzten Polymerlösungen enthalten keinen Initiator und werden nicht bestrahlt. Mit dem Anstieg der Polymerkonzentration geht auch ein deutlicher Anstieg der Rotationskorrelationszeit einher. Dies lässt sich wohl auf eine Zunahme der Viskosität zurückführen, da diese nach Gleichung (2-31) linear mit der Rotationskorrelationszeit korreliert. Allerdings muss man den Aspekt der Viskosität noch etwas detaillierter betrachten, da diese eine makroskopische Größe ist. In einem einfachen Modell betrachtet besteht ein Hydrogel aus einer festen Phase, dem Polymer, und aus einer wässrigen Phase. Nimmt man das Gel als heterogenes Zweiphasensystem an, so würde man vermuten, dass die im Gel eingebetteten Proteine im Wesentlichen von Wasser umgeben sind. Selbst bei einem Gel mit 30% Polymergehalt bestehen geschätzte 75% des Gelvolumens aus Wasser, unter der Annahme, dass das Polymer nur aus Glucose besteht und diese eine Dichte von  $1.56 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$  besitzt; bei einem 10%igen Gel sind es sogar 94%. Unter dieser Betrachtung würde man keinen so signifikanten Anstieg der Rotationskorrelationszeit vermuten. Daher muss man, um die Wechselwirkung vom eingebetteten Protein im Gel zu verstehen, zwischenmolekulare Wechselwirkungen in Betracht ziehen. Der stärkste Faktor werden Wasserstoffbrückenbindungen sein unter Beteiligung von Sauerstoffatomen des Polymers und Sauerstoff- sowie Stickstoffatome im Proteine. Darüber hinaus werden auch Dipol/Dipol- sowie Ion/Dipol-Wechselwirkungen einen Beitrag liefern. Mit steigender Polymerkonzentration sinkt der Anteil der Wechselwirkungen des Proteins mit dem Wasser und folglich steigt der Anteil der Wechselwirkungen mit dem Hydrogel. Aufgrund der einge-



schränkten Beweglichkeit des Polymernetzwerks im Vergleich zu Wassermolekülen ergibt sich dadurch eine höhere Mikroviskosität für das Protein.

Der Vergleich mit den unvernetzten Polymerlösungen gibt darüber Aufschluss, wie stark die Verlangsamung der Rotationsdiffusion durch die Vernetzung ist. Zur besseren Übersicht sind in Abbildung 74 gleiche Polymerkonzentrationen im gleichen Farbton gehalten. Es ergibt sich eine leicht höhere Einschränkung der Rotationsdiffusion für vernetzte Gele, obwohl der Unterschied bei den Messungen mit 20% Polymergehalt nicht signifikant ausfällt. Der Einfluss der Quervernetzung ist auf jeden Fall kleiner als der der Polymerkonzentration. Der Unterschied ergibt sich dadurch, dass sich in der Polymerlösung idealerweise nur einzelne lineare Polymerketten befinden, die untereinander frei beweglich sind und im Hydrogel ein dreidimensionales Netzwerk mit weniger Freiheitsgraden vorliegt. Wenn das Polymer in seiner Bewegung eingeschränkt ist, wirkt sich das durch die Interaktion des Proteins mit dem Polymer entsprechend aus. Die in Abbildung 74 dargestellten Ergebnisse stehen in Einklang mit denen in Abbildung 73 gezeigten Variationen der Quervernetzung.

Alle Kurven werden einer biexponentiellen Funktion gemäß Gleichung (2-26) angepasst. Der Offset ist für alle Kurven einheitlich gleich Null gesetzt; physikalisch bedeutet das, dass keine Restanisotropie  $r_\infty$  zugelassen wird. Die Begründung für diese Einschränkung ist bereits weiter oben im Kapitel beschrieben.

**Tabelle 9:** Fitresultate für Anisotropiezerfallskurven von mTagGFP in verschiedenen HES-P(EG)<sub>n</sub>MA Hydrogelen;  $\bar{R}^2 \geq 0.998$  für alle Funktionsanpassungen. (EG)<sub>n</sub> steht für die Anzahl der Ethylenglykoleinheiten in der Seitenkette, für MA besitzt die Seitenkette keine EG-Einheiten. Der DS ist hinter dem Querstrich vermerkt und beträgt in allen andere Fällen einheitlich 0.048. Wenn nicht vermerkt, wurden alle Hydrogele mit LAP quervernetzt. Lsg. steht als Abkürzung für unvernetzte Polymerlösung. Diese Abkürzungen werden im gesamten Kapitel verwendet.

	$g_1$	$\pm$	$\theta_1$	$\pm$	$g_2$	$\pm$	$\theta_2$	$\pm$	$r_0$	$\pm$	$\chi^2_{\text{red}}$
	%		ns		%		ns				
<b>10%(EG)<sub>6</sub>/0.048</b>	4.6	0.5	1.43	0.19	95.4	0.6	22.9	0.5	0.439	0.002	1.09
<b>10%MA/0.13</b>	4.2	0.2	0.90	0.06	95.8	0.2	22.6	0.2	0.442	0.001	1.12
<b>10%(EG)<sub>6</sub>/0.12</b>	4.4	0.2	1.11	0.09	95.6	0.3	22.8	0.3	0.443	0.001	1.46
<b>10%(EG)<sub>10</sub>/0.11</b>	4.7	0.3	1.19	0.11	95.3	0.4	22.9	0.3	0.440	0.001	1.36
<b>10% Lsg.</b>	4.6	0.2	1.02	0.07	95.4	0.3	19.8	0.2	0.434	0.001	1.47
<b>20% LAP</b>	2.9	0.2	0.76	0.10	97.1	0.2	31.0	0.4	0.445	0.001	1.40
<b>20% I2959</b>	2.6	0.2	0.81	0.10	97.4	0.2	33.2	0.4	0.446	0.001	1.06
<b>20% Lsg.</b>	3.7	0.1	0.80	0.05	96.3	0.2	31.1	0.3	0.440	0.001	1.43
<b>30% LAP</b>	2.7	0.1	0.51	0.05	97.3	0.1	62.5	1.0	0.446	0.001	1.10
<b>30% Lsg.</b>	4.0	0.1	0.68	0.05	96.0	0.2	48.9	0.7	0.443	0.001	1.32

Der Anisotropiezerfall setzt sich aus zwei deutlich unterscheidbaren Komponenten zusammen. Die schnelle Komponente ist einer partiellen freien Rotation des Chromophors im mTagGFP zuzuschreiben, welches zwar fest im Proteinkörper eingebunden ist, jedoch noch einige Rotationsfreiheitsgrade besitzt. Liu *et al.* schreiben dies für GFP-S65T einer partiellen Denaturierung in der  $\beta$ -Fass-Struktur zu.[179] Im Mittel trägt diese schnelle Rotation 4% zum Signal bei. Sie scheint unabhängig von der Viskosität der Umgebung zu sein. Die gemessene Rotationskorrelationszeit  $\theta_1$  ist nur minimal kürzer als die tatsächliche lokale Rotation der chromophoren Gruppe (siehe Gleichung (2-30)), so dass die Umrechnung an dieser Stelle nicht notwendig ist. Auffällig ist aber die deutliche Schwankungsbreite für die kurze Rotationskorrelationszeit  $\theta_1$ . Dies ist insofern problematisch für die Bestimmung der langen, viskositätsabhängigen Rotationskorrelationszeit, als dass die Parameter der angepassten Exponentialfunktion nicht unabhängig voneinander sind. Dies zeigt exemplarisch die Korrelationsmatrix aus dem Fit für Wasser.

**Tabelle 10:** Korrelationsmatrix für die Funktionsanpassung der Fluoreszenzdepolarisation von mTagGFP in 10%igen HES-P(EG)<sub>6</sub>MA/DS0.048 Hydrogel. Da die Matrix diagonalsymmetrisch ist, wurden die Werte unterhalb der Diagonale aus Gründen der Übersichtlichkeit weggelassen. Die Parameter für den x- und y-Versatz tauchen hier nicht auf, weil sie fix gesetzt sind.

	$r_{0,1}$	$\theta_1$	$r_{0,2}$	$\theta_2$
$r_{0,1}$	1	0.923	-0.989	0.984
$\theta_1$		1	-0.962	0.924
$r_{0,2}$			1	-0.988
$\theta_2$				1

Während ein Wert gegen 1 eine starke Korrelation und -1 eine Antikorrelation bedeutet, so bedeutet ein Wert von 0, dass keine Korrelation zwischen zwei Parametern vorliegt. In dem konkreten Fall sind alle Parameter stark korreliert. Wenn für den Fit ein kleinerer Wert von  $\theta_1$  ermittelt wird, so wird dadurch auch  $\theta_2$  kleiner bestimmt. Setzt man zum Beispiel für die kurze Korrelationszeit in der ersten Datenreihe in Tabelle 9 den gewichteten Mittelwert mit 0.79 ns fest, so ergibt sich für  $\theta_2$  ein Wert von  $21.5 \pm 0.1$  ns. Dadurch ergibt sich aber ein schlechteres Chi-Quadrat (1.32 im Vergleich zu 1.09) und auch die graphische Residuenanalyse (siehe Diskussion zu Abbildung 70) deutet stark auf eine schlechtere Funktionsanpassung hin. Die Abweichungen der Korrelationszeiten für andere Messkurven können weitaus deutlicher ausfallen. Daher wird dieser Ansatz verworfen. Aus dieser Problematik ergibt sich aber die grundlegende Frage, ob man durch Vorgabe physikalischer Rand-

bedingungen lieber einen schlechten Fit in Kauf nimmt oder prinzipiell unvoreingenommen immer den besten Fit für eine Funktion sucht.

Der Vergleich der langen Rotationskorrelationszeit zwischen den Proben spiegelt den qualitativen Verlauf der Kurven in Abbildung 72 bis Abbildung 74 wieder. Die initiale Anisotropie  $r_0$  liegt für alle Proben zwischen 0.44 und 0.45. Die Werte liegen deutlich über dem maximal messbaren  $r_0$  für Zweiphotonenanregung und einem Ölobjektiv mit einer numerischen Apertur von 1.3.[56,180,181] Bei einem halben Öffnungswinkel von  $59^\circ$  beträgt  $r_0$  maximal 0.379. Der Grund mag zum einen in der nicht perfekten zeitlichen Synchronisation der Intensitätskurven beider Detektorkanäle sein. Das Zeitintervall beträgt für alle GFP-Messungen 64 ps, die gemessene zeitliche Verschiebung zwischen den Detektoren jedoch nur 60 ps, so dass die Kurven nicht genau zeitlich übereinander gelegt werden können. Die Diskrepanz macht sich in einem Peak-Artefakt zum Beginn des Pulszyklus bemerkbar, besonders wenn mit einem zeitlich konstanten G-Faktor gerechnet wird. Möglich wäre aber auch, dass die Rückapertur des Objektivs nicht voll ausgeleuchtet ist. So erreicht man für einen halben Öffnungswinkel von  $49^\circ$  anstatt  $59^\circ$  eine maximale initiale Anisotropie von 0.434. Auf jeden Fall sind Absorption und Emission nahezu kollinear, was auch von anderen GFP-Varianten in der Literatur berichtet wird.[135]

Die quantitative Analyse der Fluoreszenzabklingkurven für die Hydrogele in Tabelle 11 zeigt ein relativ homogenes Bild. Es ergeben sich zwei deutlich trennbare Fluoreszenzlebensdauern, deren Ursache bereits in Kapitel 3.6 diskutiert wurde. Die Fluoreszenzlebensdauern sind unabhängig von der Polymerkonzentration, obwohl man eine Abnahme erwarten würde, da diese in Abhängigkeit zum Brechungsindex nach der Strickler-Berg-Gleichung steht und das Polymer einen höheren Brechungsindex als Wasser besitzen wird. (als Referenz: 30%ige Glucose  $n_D = 1.381$  im Vergleich zu 1.333 für Wasser)

$$\frac{1}{\tau_0} = k_F = 2.88 \cdot 10^{-9} n^2 \int \frac{(2\nu_0 - \nu)^2}{\nu} \varepsilon_\nu d\nu \quad (4-10)$$

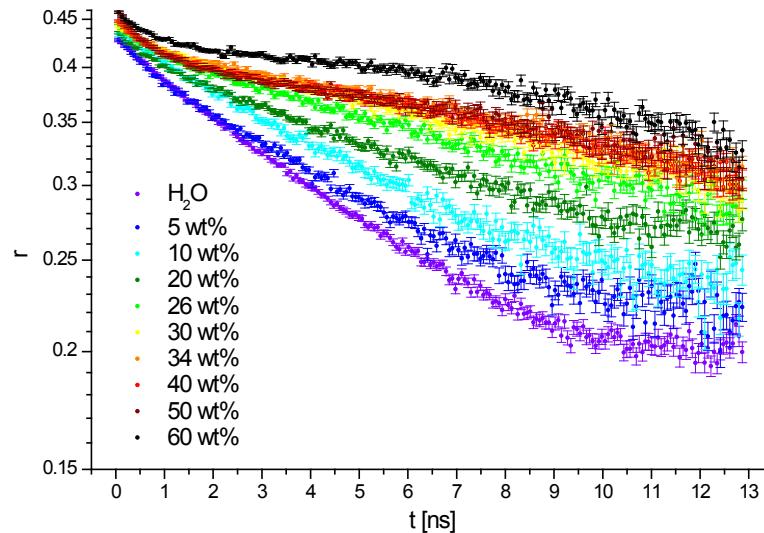
Dass keine Abhängigkeit, weder im Hydrogel, noch in der Polymerlösung beobachtet werden kann, ist durch die bereits erwähnte Tasche des Proteins zu erklären, mit dem die chromophore Gruppe in Kontakt zur molekularen Umgebung steht. In diese können Wassermoleküle eindringen, jedoch nicht große, sperrige Polymerketten. Daher besteht auch im Hydrogel die direkte molekulare Umgebung des Proteins im Wesentlichen aus Wasser.

**Tabelle 11:** Biexponentielle Fluoreszenzanalyse von mTagGFP in Hydrogelen und Polymerlösungen;  
 $\overline{R}^2 \geq 0.9999$  für alle Funktionsanpassungen.

	$F_0$	$\pm$	$F_1$	$\pm$	$\tau_1$	$\pm$	$F_2$	$\pm$	$\tau_2$	$\pm$	$\chi^2_{\text{red}}$
					ns				ns		
<b>10%(EG)<sub>6</sub>/0.048</b>	0.02	0.01	0.08	0.01	1.23	0.07	0.90	0.01	2.81	0.01	1.41
<b>10%MA/0.13</b>	0.02	0.01	0.07	0.01	1.23	0.07	0.91	0.01	2.84	0.01	1.68
<b>10%(EG)<sub>6</sub>/0.12</b>	0.02	0.01	0.07	0.01	1.17	0.05	0.91	0.01	2.83	0.01	1.22
<b>10%(EG)<sub>10</sub>/0.11</b>	0.02	0.01	0.08	0.01	1.24	0.06	0.90	0.01	2.83	0.01	1.43
<b>10% Lsg.</b>	0.02	0.01	0.07	0.01	1.27	0.06	0.91	0.01	2.88	0.01	1.28
<b>20% LAP</b>	0.02	0.01	0.08	0.01	1.26	0.08	0.90	0.01	2.76	0.01	1.35
<b>20% I2959</b>	0.02	0.01	0.08	0.01	1.24	0.08	0.90	0.01	2.74	0.01	1.48
<b>20% Lsg.</b>	0.02	0.01	0.09	0.01	1.38	0.06	0.89	0.01	2.82	0.01	1.46
<b>30% LAP</b>	0.02	0.01	0.08	0.01	1.22	0.07	0.89	0.01	2.71	0.01	1.40
<b>30% Lsg.</b>	0.02	0.01	0.09	0.01	1.43	0.10	0.89	0.01	2.80	0.02	1.51

Etwas verwunderlich sind die trotz der sehr guten Datenqualität hohen  $\chi^2$ -Werte. Dies mag damit zu tun haben, dass die verwendeten Daten jeweils das arithmetische Mittel aus fünf Einzelkurven darstellen. Da ein Hydrogel kein mikroskopisch homogenes System ist, kann es zu gewissen Schwankungsbreiten der zu bestimmenden physikalischen Größe kommen, so dass man für die Fluoreszenzlebensdauern keine diskreten Größen, sondern eine gewisse Verteilung bekommt. Die Anwendung einer gestreckten Exponentialfunktion (siehe Gleichung (4-8)) ist in diesem Fall aber nicht sinnvoll, da hier zwei differenzierbare Zustände vorliegen. Der Versuch, die Daten an eine biexponentielle gestreckte Exponentialfunktion anzupassen, liefert keine niedrigeren  $\chi^2$ -Werte.

Um quantitative Aussagen über die gefühlte Viskosität des Proteins im Hydrogel treffen zu können, ist eine Referenz mit bekannter Viskosität notwendig. Hierzu eignet sich die Verwendung von Saccharose-Wasser-Gemischen. Saccharose ist ein aus  $\alpha$ -D-Glucose und  $\beta$ -D-Fructose bestehendes Disaccharid. Es hat gegenüber der Verwendung von reiner Glucose den Vorteil, dass unter neutralem pH-Wert keine Ringöffnung erfolgt und der Zucker nicht in der offenkettigen Aldehydform vorliegt. Saccharose-Wasser Gemische werden verwendet, um eine hochviskose Umgebung für Proteine zu schaffen, ohne dass diese denaturieren. Die Viskositäten für die Gemische sind aus dem CRC Handbook of Chemistry and Physics entnommen.[168]



**Abbildung 75:** Anisotropieabklingkurven von rmTagGFP in Saccharose-Wasser-Mischungen unterschiedlicher Zusammensetzung.

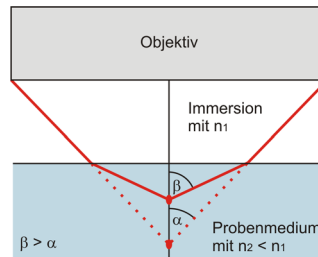
Insgesamt wurde das Anisotropieverhalten von mTagGFP in neun verschiedenen Mischungsverhältnissen von Saccharose und Wasser sowie in reinem Wasser untersucht. Zusätzlich wurde noch eine Probe in PBS vermessen, das ist ein in der Zellbiologie vielverwendeter Phosphat-pH-Puffer mit physiologischem osmotischen Druck (in Abbildung 75 nicht gezeigt). Qualitativ lässt sich festhalten, dass die Rotationskorrelationszeit wie erwartet mit der Viskosität steigt. Ab einem Saccharosegehalt von 30 Massenprozent und höher lässt sich kaum ein Unterschied in den Kurven feststellen, da die Anisotropie so langsam abfällt, dass in dem 13 ns Messfenster die Differenz vom Startwert  $r_0$  noch zu gering ist. Auch eine Vergrößerung des Messfensters durch Herabsenken der Pulswiederholrate des Lasers würde nur bedingt mehr Information bringen, da bedingt durch die relativ zur Fluoreszenzdepolarisation kurze Fluoreszenzlebensdauer kaum noch Photonen emittiert würden. Die Kurve für 60 Massenprozent scheint sich hingegen noch deutlich von dem Bereich 30-50% abzuheben. Allerdings beruhen diese Messkurven alle auf Einzelmessungen und es ist außerdem zu beachten, dass die  $r_0$ -Werte eine leichte Verschiebung zueinander erfahren. Alle Kurven werden einer biexponentiellen Funktion mit den gleichen Randbedingungen wie für die Hydrogelscheiben angepasst. Die Resultate sind in Tabelle 12 zusammengefasst.

**Tabelle 12:** Fitresultate für Anisotropiezerfallskurven von mTagGFP in verschiedenen Lösungsmitteln. Prozentangaben beziehen sich auf den Massenteil der Saccharose-Wasser Mischungen. ‚Glyk‘ steht für Glykol, ‚Glyc‘ für Glycerin, was auch im folgenden verwendet wird. (‡) Die Viskositäten sind für 20 °C angegeben, der Wert für Glykol für 25 °C. Für PBS konnte keine Viskosität ermittelt werden. Wert für Glycerin von Firma DOW®.[182]  $\bar{R}^2 \geq 0.991$  für alle Funktionsanpassungen, außer für 60% Saccharose (0.9869) und Glycerin (0.1494).

	$\eta$	$g_1$	$\pm$	$\theta_1$	$\pm$	$g_2$	$\pm$	$\theta_2$	$\pm$	$r_0$	$\pm$	$\chi^2_{\text{red}}$
	mPa·s	%		ns		%		ns				
<b>H<sub>2</sub>O</b>	1.03	9.1	1.8	2.00	0.33	90.9	2.2	14.0	0.5	0.427	0.006	0.99
<b>PBS</b>		9.3	2.0	1.95	0.35	90.7	2.5	13.7	0.6	0.431	0.006	0.87
<b>5%</b>	1.15	6.6	0.4	0.77	0.09	93.4	0.5	15.5	0.3	0.429	0.001	1.29
<b>10%</b>	1.34	6.0	2.9	1.99	0.84	94.0	3.6	17.9	1.4	0.435	0.009	1.08
<b>20%</b>	1.95	5.4	0.3	0.73	0.09	94.6	0.4	23.7	0.5	0.434	0.001	1.19
<b>26%</b>	2.57	5.8	0.3	0.68	0.07	94.2	0.3	30.6	0.6	0.443	0.001	1.24
<b>30%</b>	3.19	4.4	0.2	0.66	0.07	95.6	0.3	35.1	0.7	0.443	0.001	1.02
<b>34%</b>	4.05	6.6	0.2	0.59	0.05	93.4	0.3	46.2	1.2	0.448	0.001	1.05
<b>40%</b>	6.16	7.7	0.2	0.64	0.04	92.3	0.3	46.7	1.2	0.448	0.001	1.17
<b>50%</b>	15.4	10.5	0.2	0.64	0.03	89.5	0.3	52.4	1.6	0.457	0.001	0.91
<b>60%</b>	58.5	7.2	0.3	0.69	0.05	92.8	0.3	93.3	6.8	0.457	0.001	1.01
<b>Glyk 99%</b>	16.1 <sup>‡</sup>	12.3	0.9	1.58	0.15	87.7	1.1	67.7	7.9	0.457	0.003	0.90
<b>Glyc 99%</b>	1150	-	-	-	-	100	-	142.0	32.9	0.462	0.001	1.31

Auch für die Referenzlösungen sind deutlich zwei Komponenten für den Anisotropiezerfall erkennbar. Im Mittel trägt die schnelle Rotation 7% zum Signal bei und damit etwas mehr als bei den Hydrogel-Messungen. Bemerkenswert ist auch hier die Tatsache, dass die kurze Rotationskorrelationszeit  $\theta_1$  für drei Proben deutlich von den anderen nach oben abweicht, jedoch auch eine deutlich größere Bestimmungsunsicherheit aufweist. Auch hier ist der Einfluss auf die Bestimmung der langen Rotationskorrelationszeit  $\theta_2$  gegeben. Da für die Referenzproben die Viskosität bekannt ist, lässt sich über Gleichung (2-31) das hydrodynamische Volumen zu  $56 \text{ nm}^3$  in Wasser berechnen. Dies entspricht einer Kugel mit einem Durchmesser von 4.8 nm oder unter Berücksichtigung der Zylindergeometrie einem Zylinder mit einem Durchmesser von 3.4 nm und einer Höhe von 6.0 nm. Damit übersteigt die tatsächliche Größe des rotierenden Proteins gut das Dreifache verglichen mit den Röntgenstrukturdaten für den GFP-Wildtyp (2.4 nm Durchmesser und 4.2 nm Höhe, entspricht  $19 \text{ nm}^3$ ).[72] Dies entspricht nach Gleichung (2-31) einer Hydrathülle von 0.56 mL pro Gramm Protein.

Die initiale Anisotropie  $r_0$  steigt mit steigender Viskosität von 0.43 für Wasser leicht bis auf 0.46 an. Dieser Versatz ist durch den zunehmenden Brechungsindex der Lösungen zu erklären. In Wasser beträgt der Brechungsindex 1.33, in 60%iger Saccharoselösung immerhin schon 1.44. Damit ist die Diskrepanz zum Brechungsindex des Immersionsmediums (1.518) für konzentrierte Saccharoselösungen geringer und der effektive Öffnungswinkel kleiner.



**Abbildung 76:** Änderung des effektiven Öffnungswinkels des Objektivs durch einen vom Immersionsmedium unterschiedlichen Brechungsindex.

Nach Fisz *et al.* ist daher eine höhere maximale Anisotropie messbar.[181] Bei den Hydrogelscheiben ist diese Tendenz nicht erkennbar, da hier die maximal verwendete Polymerkonzentration 30 Massenprozent beträgt und der Brechungsindexunterschied gering ausfällt.

Die Untersuchung des Fluoreszenzzerfalls des GFP-Fluorophors ergibt einen biexponentiellen Zusammenhang. Die relativen Verhältnisse zwischen kurzer und langer Lebensdauer weisen keinen Trend auf.

**Tabelle 13:** Biexponentielle Fluoreszenzanalyse von mTagGFP in Referenzlösungen;  $\bar{R}^2 \geq 0.9999$  für alle Funktionsanpassungen, außer 0.998 für Glycerin.

	$F_0$	$\pm$	$F_1$	$\pm$	$\tau_1$	$\pm$	$F_2$	$\pm$	$\tau_2$	$\pm$	$\chi^2_{\text{red}}$
					ns				ns		
<b>H<sub>2</sub>O</b>	0.020	0.001	0.11	0.01	1.39	0.09	0.87	0.01	2.95	0.02	1.08
<b>PBS</b>	0.023	0.002	0.18	0.06	1.76	0.20	0.80	0.06	2.99	0.08	1.20
<b>5%</b>	0.023	0.001	0.14	0.02	1.33	0.10	0.83	0.02	2.78	0.03	1.16
<b>10%</b>	0.024	0.002	0.14	0.04	1.47	0.18	0.84	0.04	2.78	0.05	1.14
<b>20%</b>	0.021	0.001	0.18	0.03	1.43	0.10	0.80	0.03	2.70	0.04	1.12
<b>26%</b>	0.022	0.001	0.12	0.02	1.39	0.12	0.85	0.02	2.72	0.03	1.15
<b>30%</b>	0.020	0.001	0.20	0.03	1.49	0.09	0.78	0.03	2.66	0.04	0.90
<b>34%</b>	0.021	0.001	0.11	0.02	1.21	0.09	0.87	0.02	2.56	0.02	1.16
<b>40%</b>	0.019	0.001	0.17	0.02	1.34	0.07	0.81	0.02	2.52	0.03	1.16
<b>50%</b>	0.020	0.001	0.18	0.02	1.32	0.07	0.80	0.02	2.44	0.03	0.97
<b>60%</b>	0.020	0.001	0.12	0.02	1.20	0.08	0.86	0.02	2.38	0.02	1.26
<b>Glyk</b>	0.029	0.001	0.20	0.02	1.08	0.05	0.77	0.02	2.47	0.03	1.39
<b>Glyc</b>	0.049	0.003	0.21	0.03	0.73	0.12	0.74	0.03	2.08	0.06	1.71

Für beide Lebensdauern zeigt sich ein klarer Abwärtstrend. Hier greift die in Gleichung (4-10) aufgezeigte Abhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauer vom Brechungsindex. Im Gegensatz zu den Hydrogelen und Polymerlösungen sind für die Referenzlösungen alle Moleküle klein genug, um in die Bindungstasche des Proteins zu gelangen und damit Einfluss auf das Chromophor zu nehmen. Der gleiche Zusammenhang wurde von Bearman *et al.* für EGFP in Glycerin-Wasser Mischungen gefunden.[183] Intramolekulare Verdrehung und diffusionskontrollierte Kollisionsfluoreszenzlöschung wie von Suhling *et al.* für EGFP beschrieben scheinen hingegen keinen nennenswerten Einfluss zu haben, da durch diese Prozesse mit höherer Solvensviskosität die Fluoreszenzlebensdauer ansteigt.[184] Zur quantitativen Auswertung des Zusammenhanges wird gemäß Gleichung (4-10)  $\tau \propto \frac{1}{n^2}$  gesetzt. Darüber lässt sich aus zwei bekannten Fluoreszenzlebensdauern und einem bekannten Brechungsindex ein unbekannter Brechungsindex berechnen. Dabei wird davon ausgegangen, dass sich die Viskosität nicht ändert, die zumindest prinzipiell die Rate des strahlungslosen Zerfalls und damit die Fluoreszenzlebensdauer beeinflussen könnte. Suhling *et al.* konnten aus ihren Messungen keine Abhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauer von der Viskosität für EGFP ableiten.[184]

**Tabelle 14:** Vergleich von über die Fluoreszenzlebensdauer berechnete Brechungsindizes mit Literaturwerten.[168] Dabei werden die Werte in Wasser als Referenz für die berechneten Brechungsindizes genommen.

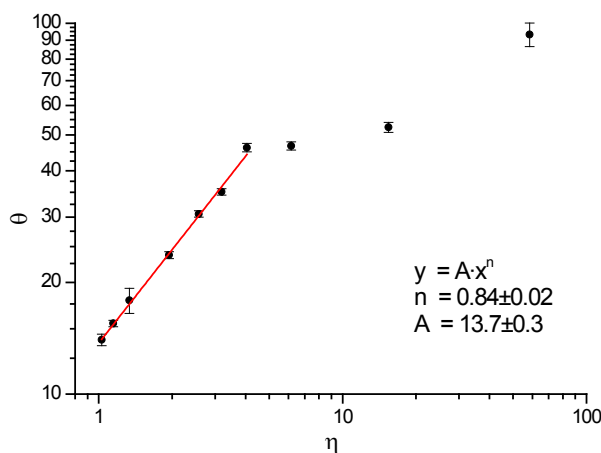
	$n_{\text{Lit.}}$	$\tau$	$n_{\text{ber.}}$	$\Delta n$
	ns			
<b>H<sub>2</sub>O</b>	1.333	2.95	-	-
<b>5%</b>	1.340	2.78	1.372	0.032
<b>10%</b>	1.348	2.78	1.373	0.026
<b>20%</b>	1.364	2.70	1.393	0.029
<b>26%</b>	1.374	2.72	1.387	0.013
<b>30%</b>	1.381	2.66	1.404	0.023
<b>34%</b>	1.389	2.56	1.429	0.041
<b>40%</b>	1.400	2.52	1.442	0.043
<b>50%</b>	1.420	2.44	1.466	0.046
<b>60%</b>	1.442	2.38	1.483	0.042
<b>Glyk</b>	1.432	2.47	1.457	0.025
<b>Glyc</b>	1.474	2.08	1.587	0.114

Sieht man von einer konstanten Überschätzung des Brechungsindex durch die Berechnung über die Fluoreszenzlebensdauer ab, ergibt sich außer für Glycerin eine sehr gute Korrelation.



Da alle Werte relativ zu Wasser gerechnet sind, ist die errechnete Fluoreszenzlebensdauer für Wasser etwas zu hoch; mit  $\tau = 2.8$  ns ergäbe sich eine sehr gute Übereinstimmung mit den Literaturwerten. Der Lebensdauerwert stammt aus einer Einzelmessung; durch Messungswiederholung ergäbe sich ein zuverlässigerer Wert. Ferner zeigt sich durch dieses Ergebnis, dass die Umgebungsviskosität keinen oder nur einen vernachlässigbaren Einfluss auf den angeregten Zustand des GFP-Chromophors hat. Dies unterstützt die Vorstellung, dass das Chromophor zwar über ein Tasche im Protein in Kontakt zur Umgebung steht, jedoch fest in das umgebende Aminosäurerüst integriert ist.

Trägt man die lange Rotationskorrelationszeit in Tabelle 12 gegen die Viskosität des Lösungsmittels auf, so ergibt sich der in Abbildung 77 dargestellte Zusammenhang.



**Abbildung 77:** Doppeltlogarithmische Auftragung der Rotationskorrelationszeit gegen die Lösungsmittelviskosität für mTagGFP und nichtlinearer Fit mit einer Potenzfunktion.

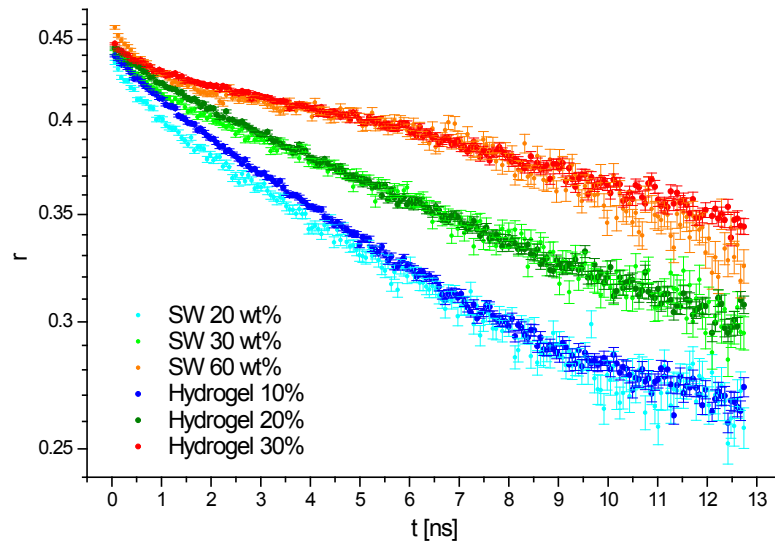
Es zeigt sich ein linearer Bereich bis circa  $5 \text{ mPa}\cdot\text{s}^{-1}$ , der einer Saccharoselösung mit 35% Gewichtsanteil beziehungsweise 2.3 Molprozent entspricht. Suhling *et al.* erzielten ähnliche Ergebnisse für EGFP in Glucose und Fructose.[184] Für höhere Viskositäten flachen die Werte stark ab, welche aber durch die flachen Anisotropiezerfallskurven nur mit abnehmender Präzision ermittelt werden können. Zusätzlich ergibt sich auch noch eine Unsicherheit durch den unbekannten Hintergrundbeitrag, der eine artifizielle Rechtskrümmung der Anisotropiekurven erzeugt und damit tendenziell kleinere Rotationskorrelationszeiten vortäuscht. Ein weiterer Grund für das Abflachen liegt wahrscheinlich aber auch in der unterschiedlichen starken Wechselwirkung des Proteins mit Wasser und Saccharose, welche stark unterschiedliche Moleküle sind. Bei kleinen Anteilen von Saccharose wird das Protein vornehmlich mit einer Hydrathülle umgeben sein, so dass das Protein primär von Wasser umgeben ist und nur sekundär durch die Rotationsbehinderung der deutlich größeren Saccharosemoleküle in Wechselwirkung mit selbigem tritt. Bei größeren Anteilen hingegen wird wohl auch eine primäre Wechselwirkung zwischen Saccharose und dem Protein statt-

finden, die vielleicht weniger stark als mit Wassermolekülen ist. Chuang und Eisenthal haben ähnliche Effekte für Rhodamin 6G in Alkoholen beobachtet.[185] Einen weiteren Hinweis liefert Gleichung (2-31). Dem Protein ist zusätzlich zur reinen Aminosäuresequenz noch eine Hydrathülle anheftend, die je nach Umgebung unterschiedlich groß ausfallen kann. Dadurch ändert sich dann die tatsächliche Größe des sich drehenden Moleküls. Natürlich ist auch immer eine Denaturierung des Proteins denkbar. In der Praxis erweist sich GFP aber als sehr stabil,[127,186] so dass eine Denaturierung in hochkonzentrierter Zuckerlösung unwahrscheinlich erscheint.\* Passt man an die Daten eine Potenzfunktion der Form  $A \cdot x^n$  an, so ergibt der Exponent die Abweichung von einem linearen Zusammenhang von Viskosität und Rotationskorrelationszeit gemäß Gleichung (2-31) mit dem Wert eins an. Eine Steigung von 0.84 zeigt also eine leichte Abweichung von der Linearität, wobei sich durch weitere Messpunkte und Wiederholungen von Messungen gewiss ein zuverlässigerer Wert ermitteln ließe. Für höhere Viskositäten wird der Exponent noch kleiner und damit die Abweichung von der Linearität noch stärker. Der Vorfaktor der Potenzfunktion entspricht dem extrapolierten Wert der Rotationskorrelationszeit für eine Viskosität mit dem Wert Null; in der Praxis hat er aber nur begrenzt Aussagekraft.

In Tabelle 12 sind auch Werte für die Polyalkohole Glykol und Glycerin gegeben. Der Vergleich der Rotationskorrelationszeit in Glykol mit einer 50%igen Saccharoselösung ergibt bei fast gleicher Viskosität ähnliche Werte. Ein Hypothesentest ergibt, dass die beiden Proben nicht mit 95%iger Sicherheit unterschieden werden können. Auch für das hochviskose Glycerin ergibt sich noch eine messbare Abklingkurve mit nur einer bestimmaren Abklingzeit. Jedoch ist der erhaltene Wert für die Rotationskorrelationszeit mit großer Unsicherheit behaftet, da die Abklingzeit im Verhältnis zum Messfenster und der Fluoreszenzlebensdauer sehr groß ist. Einschränkend ist zu bemerken, dass im Glykol und Glycerin 1% Wasser vorliegt, da das Protein in wässriger Lösung geliefert wurde. Für Glykol konnte kein entsprechender Viskositätswert gefunden werden. Darüber hinaus sind alle Messungen nicht bei genau 20 °C oder 25 °C durchgeführt worden, sondern je nach Raumtemperatur bei 22-23 °C. Auch ist eine lokale Erwärmung der Probe im Laserfokus nicht komplett auszuschließen; Untersuchungen im Arbeitskreis haben ergeben, dass bei höheren Anregungsleistungen dieser Effekt nicht vernachlässigt werden kann. Da bei höherer Viskosität der Wärmetransport langsamer ist, könnte hier der Effekt verstärkt auftreten und ein Abflachen der Werte in Abbildung 77 mit verursachen.

---

\* Das wt-GFP ist stabil bei 65 °C, pH 11 und unter 6 M Guanidinhydrochlorid, einem häufig verwendeten Denaturierungsmittel.[187]



**Abbildung 78:** Vergleich der Anisotropieabklingkurven von rmTagGFP in Hydrogelen unterschiedlicher Polymerkonzentration mit ausgewählten Saccharose-Wasser-Mischungen (SW).

Der qualitative Vergleich in Abbildung 78 zeigt eine relativ gute Übereinstimmung der Anisotropieabklingkurven von Hydrogelen und Saccharose-Wasser Mischungen. Die Hauptunterschiede liegen in den bereits diskutierten Unterschieden für  $r_0$  und dem prozentualen Anteil der kurzen Rotationskorrelationszeit. Über die angepasste Potenzfunktion lässt sich eine Viskosität für das mTagGFP in den Hydrogelen ermitteln. In Tabelle 15 ist neben den errechneten Werten noch die Viskosität für die Saccharose-Wasser-Mischung angegeben, welche qualitativ am besten zu den Anisotropieabklingkurven der Hydrogele passt. Zusätzlich ist der Rotationsdiffusionskoeffizient mit angegeben, der unter der vereinfachenden Annahme eines kugelförmigen Moleküls berechnet wird.

**Tabelle 15:** Errechnete Rotationsdiffusionskoeffizienten des mTagGFP und Viskositäten für vermessene Hydrogele und Vergleich mit ausgewählten Saccharose-Wasser-Mischungen (SW).

	$D_{\text{rot}}$	$\pm$	$\eta$	$\pm$		$\eta$
	$\cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$		mPa·s			mPa·s
<b>10%(EG)<sub>6</sub>/0.048</b>	7.3	0.2	1.85	0.07	20% SW	1.95
<b>10%MA/0.13</b>	7.4	0.1	1.82	0.05		
<b>10%(EG)<sub>6</sub>/0.12</b>	7.3	0.1	1.83	0.06		
<b>10%(EG)<sub>10</sub>/0.11</b>	7.3	0.1	1.85	0.06		
<b>10% Lsg.</b>	8.4	0.1	1.55	0.04		
<b>20% LAP</b>	5.4	0.1	2.65	0.08	30% SW	3.19
<b>20% I2959</b>	5.0	0.1	2.87	0.09		
<b>20% Lsg.</b>	5.4	0.1	2.65	0.08		
<b>30% LAP</b>	2.7	0.1	6.09	0.23	60% SW	58.5
<b>30% Lsg.</b>	3.4	0.1	4.55	0.16		

Der Vergleich der errechneten Viskositäten mit den qualitativ am besten passenden Anisotropieabklingkurven der Saccharose-Wasser Mischungen ergibt eine relativ gute Übereinstimmung für Hydrogele mit 10% und 20% Polymergehalt. Für 30%ige Hydrogele ergibt sich eine große Diskrepanz. Dies ist zum einen mit der unzulässigen Extrapolation der Fitfunktion außerhalb des geeigneten Bereichs zu begründen, zum anderen mit dem beliebig ungenauen qualitativen Vergleich der Abklingkurven.

#### *TurboGFP und Vergleich mit mTagGFP*

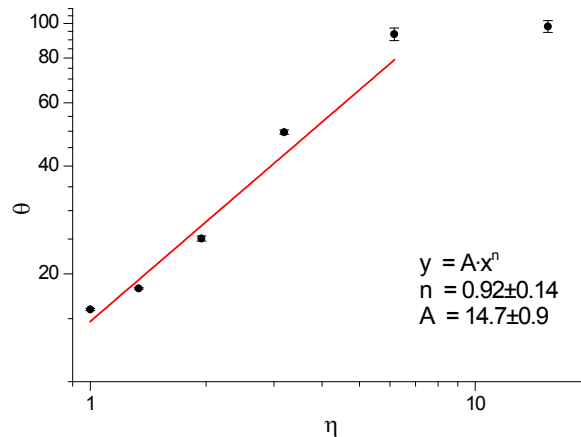
Der wesentliche Unterschied zwischen TurboGFP und mTagGFP ist, wie bereits in Kapitel 3.6 und 3.7 beschrieben, die Quartärstruktur. Während mTagGFP laut Hersteller als Monomer in Lösung vorliegen soll, ist TurboGFP als Dimer vorzufinden. mTagGFP besitzt eine Molekularmasse von 27 kDa, das TurboGFP-Dimer ist mit 52 kDa fast doppelt so schwer und würde damit näher an der Molekularmasse von 144 kDa für IgG-Antikörper als Zielmoleküle liegen. Da die Molekularmasse eine direkte Auswirkung auf das Molekylvolumen hat, sollte auch die Rotationskorrelationszeit entsprechend höher liegen. Um Vergleichbarkeit zu schaffen, wurde TurboGFP in den gleichen Saccharose-Wasser Mischungen wie mTagGFP vermessen.

**Tabelle 16:** Fitresultate für Anisotropiezerfallskurven von TurboGFP in Wasser und verschiedenen Saccharose-Wasser-Mischungen.  $\overline{R^2}$  ist 0.998 für Wasser und sinkt graduell auf 0.936 für 50%ige Saccharoselösung.

	$\eta$	$g_1$	$\pm$	$\theta_1$	$\pm$	$g_2$	$\pm$	$\theta_2$	$\pm$	$r_0$	$\pm$	$\chi^2_{\text{red}}$
	mPa·s	%		ns		%		ns				
<b>H<sub>2</sub>O</b>	1.03	-	-	-	-	100	-	16.0	0.1	0.426	0.001	1.0966
<b>10%</b>	1.34	-	-	-	-	100	-	18.2	0.1	0.434	0.001	1.5821
<b>20%</b>	1.95	0.8	0.2	0.55	0.34	99.2	0.3	25.1	0.4	0.439	0.001	1.0165
<b>30%</b>	3.19	-	-	-	-	100	-	49.7	0.7	0.441	0.001	1.2369
<b>40%</b>	6.16	1.2	0.2	0.43	0.15	98.8	0.2	93.3	3.7	0.454	0.001	0.9315
<b>50%</b>	15.4	1.7	0.3	0.21	0.07	98.3	0.2	98.1	3.8	0.452	0.001	1.2110

Für einige Messkurven lässt sich keine biexponentielle Funktion anpassen; es wird nur die lange Rotationskorrelationszeit gefunden. Dies verwundert aber nicht, denn für die Kurven mit einem kurzen Anteil beträgt dieser nur 1-2%. Im Vergleich zu mTagGFP heißt das, dass die chromophore Gruppe fester im Proteingebilde sitzt. Bei der initialen Anisotropie ist genau wie beim mTagGFP ein leichter Anstieg von 0.43 auf 0.45 zu verzeichnen. Es ergeben sich wie zu erwarten gleiche initiale Anisotropien, da das Fluorophor in beiden Fällen identisch ist. Analog zum mTagGFP ergibt sich durch doppeltlogarithmisches Auftragen der Rotations-

korrelationszeit gegen die Viskosität eine Gerade (Abbildung 79). Der Nullpunktswert liegt mit 14.7 ns nur unwesentlich höher als für mTagGFP mit 13.7 ns. Der Grad der Linearität ist hier mit 0.92 zwar näher am theoretischen Wert von eins, jedoch aufgrund schlechterer Datenqualität auch mit einem größeren Fehler behaftet. Der lineare Bereich ist auch beim TurboGFP bis circa  $5 \text{ mPa}\cdot\text{s}^{-1}$  zu sehen.



**Abbildung 79:** Doppeltlogarithmische Auftragung der Rotationskorrelationszeit gegen die Lösungsmittelviskosität für TurboGFP und nichtlinearer Fit mit einer Potenzfunktion.

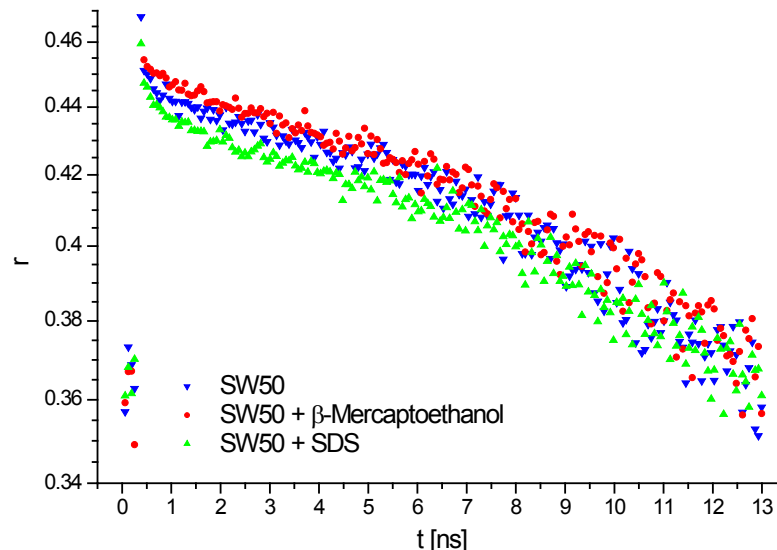
Der Vergleich der langen Rotationskorrelationszeit, die der globulären Rotation des Proteins zugewiesen werden kann, ist für beide GFP-Mutanten in Tabelle 17 gegenübergestellt.

**Tabelle 17:** Gegenüberstellung von Rotationskorrelationszeit und Rotationsdiffusionskoeffizient für mTagGFP und TurboGFP.

	$\eta$	$\theta_{\text{mTag}}$	$\pm$	$D_{\text{rot,mTag}}$	$\pm$	$\theta_{\text{Turbo}}$	$\pm$	$D_{\text{rot,Turbo}}$	$\pm$
	$\text{mPa}\cdot\text{s}$	ns		$\cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$		ns		$\cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$	
<b>H<sub>2</sub>O</b>	1.03	14.0	0.5	11.9	0.5	16.0	0.1	10.4	0.1
<b>10%</b>	1.34	17.9	1.4	9.3	0.7	18.2	0.1	9.2	0.1
<b>20%</b>	1.95	23.7	0.5	7.0	0.2	25.1	0.4	6.6	0.1
<b>30%</b>	3.19	35.1	0.7	4.8	0.1	49.7	0.7	3.4	0.1
<b>40%</b>	6.16	46.7	1.2	3.6	0.1	93.3	3.7	1.8	0.1
<b>50%</b>	15.4	52.4	1.6	3.2	0.1	98.1	3.8	1.7	0.1

Wie zu erkennen ist, unterscheiden sich die Rotationskorrelationszeit für niedere Viskositäten kaum. Erst für höhere Viskositäten jenseits von  $2 \text{ mPa}\cdot\text{s}^{-1}$  laufen die Werte auseinander, und zwar steigen die Werte für das dimere TurboGFP stärker als für das monomere mTagGFP. Nach dem einfachen Modell von Gleichung (2-31) sollte sich für die doppelte Molekularmasse unter sonst identischen Bedingungen eine doppelt so hohe Rotationskorrelationszeit ergeben. Dies ist nur für die hohen Viskositäten für eine 40%ige und 50%ige

Saccharose-Wasser Mischung der Fall. Daher stellt sich die Frage, ob mTagGFP immer als Monomer vorliegt beziehungsweise TurboGFP immer als Dimer. In der Literatur berichten Volkmer *et al.* für den Wildtyp und die S65T-Punktmutation (entspricht EGFP ohne F64L-Mutation) Rotationskorrelationszeiten in Pufferlösung von  $15\text{-}17\pm 1$  ns,[135] Borst *et al.* für ECFP  $14.8\pm 1.3$  ns und für EYFP  $15.6\pm 1.4$  ns.[188] EGFP und EYFP werden als schwaches Dimer klassifiziert,[189] das heißt erst bei hohen Konzentration im millimolaren Bereich neigen diese Moleküle zur Dimerisierung. Da die Konzentration für alle Experimente im niedrigen bis sub-mikromolaren Bereich liegt, spricht dies dafür, dass sowohl mTagGFP, als auch TurboGFP in niedrig konzentrierten Saccharoselösungen als Monomer vorliegen. Zur genaueren Untersuchung des Phänomens wird das dimere TurboGFP in Lösungen mit  $\beta$ -Mercaptoethanol beziehungsweise Natriumdodecylsulfat (SDS) gebracht. Mercaptoethanol wird zur Reduktion von Disulfidbrücken zu Thiolen zwischen Proteinoligomeren verwendet. SDS ist als Tensid aktiv und bricht hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Proteinoligomeren auf. Es findet in der Gelelektrophorese breite Anwendung. Der Hersteller Evrogen gibt an, dass bei einer SDS-PAGE eine Bande mit 26 kDa vorliegt, was für ein Monomer spricht. Beide Reagenzien können die Denaturierung des Proteins hervorrufen. Die Röntgenstrukturanalyse des tetrameren GFP im Kristall (PDB-Code 2G6X) von Evdokimov *et al.* deutet auf hydrophobe Wechselwirkungen zwischen mehreren Aminosäuren hin, außerdem enthält das Protein ein außenliegendes Cystein (C8), welches die Voraussetzung für eine Disulfidbrücke mit sich bringt.[127] Mercaptoethanol wird als 5 %ige Lösung (0.72 mM) eingesetzt, SDS als 1%ige Lösung (3.5 mM) unterhalb der kritischen Konzentration zur Mizellenbildung[190] und TurboGFP liegt mit  $0.2\text{ }\mu\text{M}$  vor, also im großen Überschuss relativ zu den eingesetzten Reagenzien. Neben diesen drei Lösungen wird noch zusätzlich jeweils eine 50%ige Saccharoselösung hergestellt, wobei die Konzentrationen vom Thiol und dem SDS bezogen auf den Wasseranteil gleich bleiben.

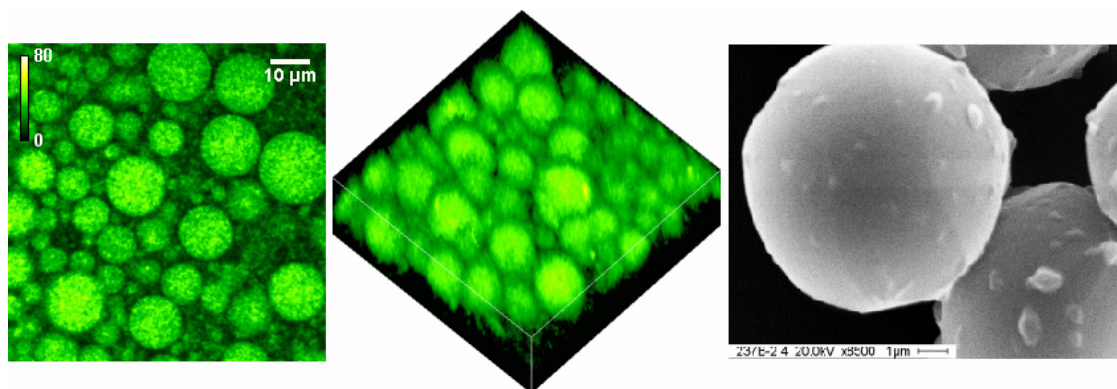


**Abbildung 80:** Vergleich der Anisotropieabklingkurve von TurboGFP in 50%iger Saccharoselösung (SW50) mit Zusätzen von  $\beta$ -Mercaptoethanol beziehungsweise Natriumdodecylsulfat (SDS).

Für das Experiment ergeben sich sowohl qualitativ (siehe Abbildung 80) als auch quantitativ für 50%ige Saccharoselösung und Wasser (nicht gezeigt) keine signifikanten Unterschiede in der Anisotropieabklingkurve. Daraus lässt sich schließen, dass entweder das SDS trotz großen Überschusses nicht ausreicht, um die hydrophoben Wechselwirkungen aufzuspalten, was aber gegen die Herstellerangaben für SDS-PAGE spricht, oder das TurboGFP bereits monomer vorliegt, was aber auch im Widerspruch zu den Herstellerangaben steht. Da die genauen Vorgänge zur Proteinaggregation in dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden können, stellt sich TurboGFP als ungeeignetes Reportermolekül für Fluoreszenz-anisotropie-Untersuchungen heraus.

### *Hydrogel-Mikropartikel*

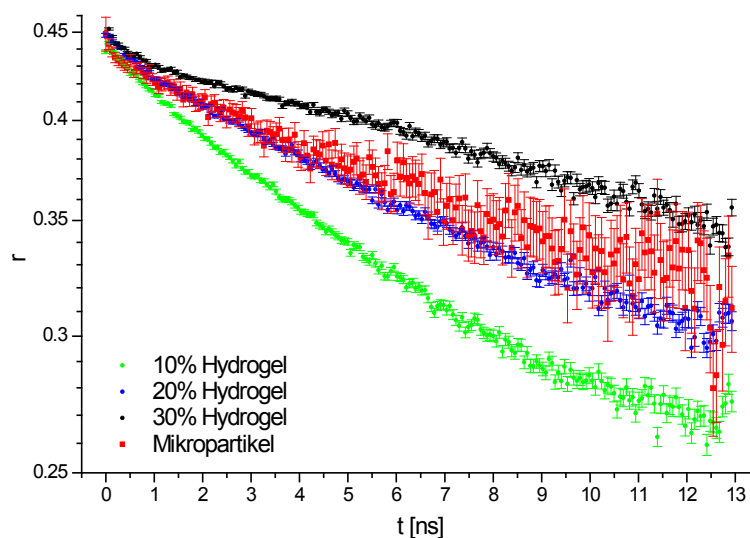
Ein wichtiger Aspekt ist die Übertragbarkeit der Ergebnisse der Hydrogelscheiben auf Mikropartikel, die eine andere Darreichungsform sind. Da sowohl die Präparation der Hydrogelscheiben, als auch deren fluoreszenzmikroskopische Untersuchung sich wesentlich einfacher gestaltet, soll zuerst einmal nur die grundsätzliche Vergleichbarkeit überprüft werden. In Abbildung 81 ist die Fluoreszenz von Mikropartikeln gezeigt. Durch das Emulsionsverfahren ergeben sich nahezu perfekt kugelförmige Partikel mit glatter Oberfläche (siehe REM-Bild) und eine unimodale Größenverteilung mit einem Mittelwert von 10  $\mu\text{m}$ .<sup>[47]</sup> Das Fluoreszenzintensitätsbild zeigt eine homogene Verteilung des mTagGFP innerhalb der Partikel.



**Abbildung 81:** Fluoreszenzfalschfarbenbild von mTagGFP-beladenen Mikropartikeln (links), 3D-Bild der Mikropartikel (mittig), REM-Bild (rechts, Institut für Pharmazeutische Technologie, TU Braunschweig).

Um die Größenverteilung in der Fluoreszenzmikroskopie überprüfen zu können, muss die Probe dreidimensional abgerastert werden, da ein einzelnes Bild nur einen 2D-Schnitt ergibt. Da ein beliebiger Schnitt durch eine Kugel immer einen Kreis ergibt, würde sich das in einer anderen, kleineren Größenverteilung widerspiegeln. Die Untersuchung der Fluoreszenzdepolarisation in den Mikropartikeln erzielt sehr ähnliche Ergebnisse zu den Hydrogelscheiben (Abbildung 82). Dabei fällt zuerst das relativ schlechte Signal-Rausch-Verhältnis auf, obwohl die eingesetzte GFP-Konzentration sogar höher ist als für die Gelscheiben. Es wird vermutet, dass während der Partikelherstellung GFP in die PEG-Phase diffundiert und daher die Konzentration in den Mikropartikeln kleiner als eingesetzt ist. Bemerkenswert ist, dass die Anisotropieabklingkurve in etwa der einer Hydrogelscheibe mit 20 Massenprozent Polymer entspricht, obwohl in der wässrigen Ausgangsphase nur 2 Massenprozent Polymer eingesetzt werden. Diese Aufkonzentrierung spricht für Diffusion von Wasser, wahrscheinlich zusammen mit dem gelösten GFP, aus der HES-Polymerphase in die PEG-Phase. Zum Einschluss von pharmazeutisch wirksamen Substanzen muss der Herstellungsprozess dahingehend optimiert werden, dass der Verlust minimiert wird.





**Abbildung 82:** Anisotropieabklingkurve für Mikropartikel und Vergleich mit Anisotropieabklingkurven von Hydrogelscheiben. Der DS beträgt 0.048 für die Hydrogele und 0.044 für die Mikropartikel.

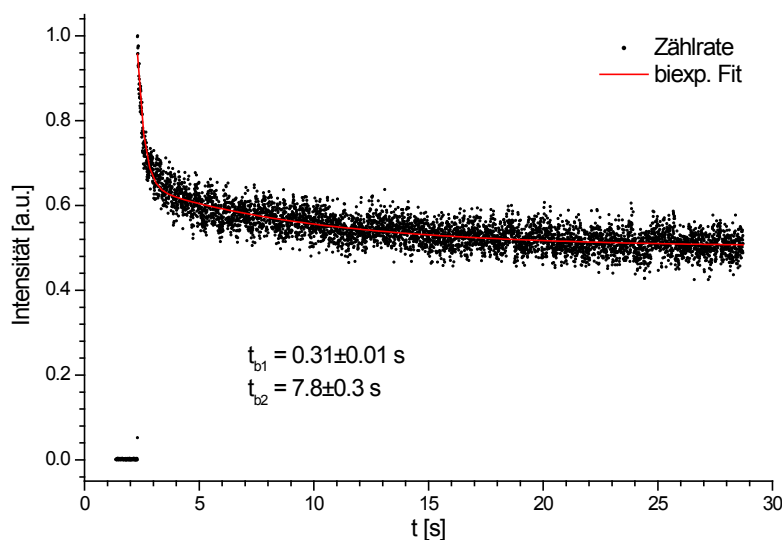
Auch die Fluoreszenzlebensdaueranalyse ist mit den Untersuchungen der Gelscheiben konform. Es ergibt sich eine biexponentielle Abklingkurve mit Lebensdauern von etwa 1.0 ns und 2.5 ns.

#### 4.2.2 FRAP- und Bleich-Messungen an mTagGFP-Hydrogelen

Für die FRAP-Messungen wird derselbe Aufbau wie für die Anisotropiemessungen (Abbildung 12) verwendet. Auch wenn nicht polarisationsaufgelöst gemessen werden muss, so bleibt der Umbau beim Wechsel von Anisotropie- zu FRAP-Messungen und umgekehrt erspart, so dass beide Messungen mit einem Gel direkt hintereinander durchgeführt werden können. Es ist wert anzumerken, dass dies mit anderen Fluoreszenzmethoden zur Untersuchung der Translationsdiffusion wie der Fluoreszenzkorrelationspektroskopie oder dem Einzelmolekültracking nicht möglich ist. Für die genannten Methoden werden Fluorophorkonzentrationen im nanomolaren Bereich benötigt; diese würden hingegen für Fluoreszenzanisotropiemessungen kein ausreichendes Signal generieren. Um die aufkommende Datenmenge zu verringern, kann außerdem ein Detektor abgeschaltet oder der Polarisationswürfel ausgebaut werden. Durch Anregung mit zirkular polarisiertem Licht lassen sich eventuell auftretende Polarisierungseffekte minimieren. Das Bleichen wird durch mehrmaliges Scannen eines kleinen Quadrats mit hoher Laserleistung realisiert. Braeckmans *et al.* zeigen, dass bei gleicher Strahlendosis wiederholtes Bleichen mit geringerer Leistung in einer größeren Bleichtiefe resultiert.[86] Da in dem Programm SymPhoTime zur Steuerung des Piezoscanners keine Option für eine kreisrunde Scanfläche implementiert ist, wurde ein Quadrat mit einer Kantenlänge von 4-5  $\mu\text{m}$  gebleicht. Die Breite des Bleichprofils in axialer Dimension wurde zu circa 4.4  $\mu\text{m}$  bestimmt und ist damit deutlich größer als die beugungs-

limitierte  $z$ -Auflösung von circa  $1\ \mu\text{m}$ . Somit besitzt das gebleichte Volumen in etwa die Form eines Würfels. Die gemessene Bleichleistung unter dem Objektiv beträgt circa  $48\ \text{mW}$ ; die FRAP-Messung wird mit  $3\text{--}4\ \text{mW}$  bei  $930\ \text{nm}$  durchgeführt. Mit der Bleichleistung befindet man sich am Rande der Anregungssättigung, wenn man den Wert mit den Daten von Brown *et al.* für wt-GFP vergleicht.[84] Für die Abhängigkeit der Bleichtiefe von der Laserleistung haben sie einen quadratischen Zusammenhang gefunden. Während des Bleichvorgangs muss die Fluoreszenzdetektion geblockt werden, da sonst eine Übersättigung und damit auch Schädigung der empfindlichen APD-Detektoren auftreten kann, die einen relativ niedrigen Dynamikbereich besitzen und deren Empfindlichkeit nicht geregelt werden kann. Um den Bleichvorgang trotzdem zeitlich aufnehmen zu können, wird für manche Experimente ein 10% Graufilter zur Signalabschwächung in den Detektionsweg eingefügt. Nach dem Bleichvorgang wird die Laserintensität auf das vorherige Niveau zurückgestellt und eine Zeitserie gestartet.

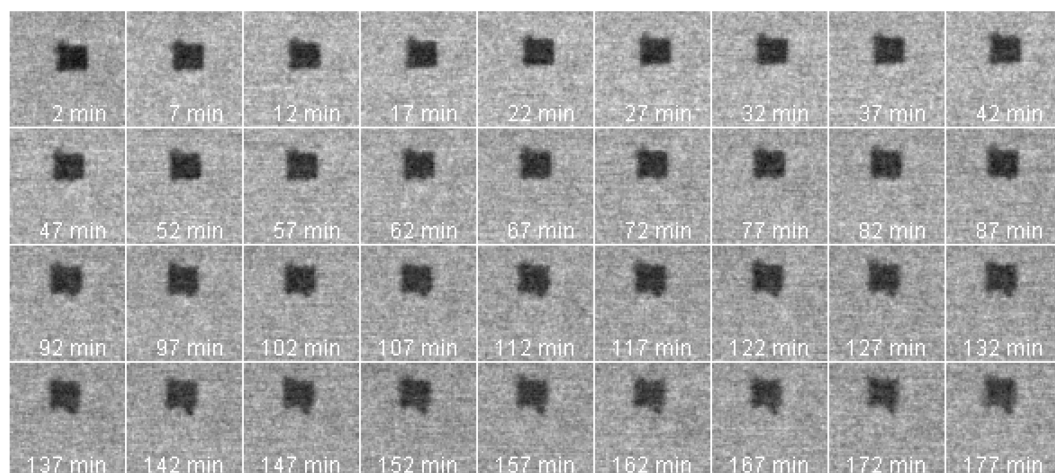
FRAP-Untersuchungen an eingeschlossenen Proteinen sind repräsentativer als mit niedermolekularen Farbstoffen, da im einfachsten Fall die Molekulargröße relativ zur Verteilung der Maschengröße des dreidimensionalen Polymernetzwerks der ausschlaggebende Faktor für die Diffusionsgeschwindigkeit ist. Daneben spielen zwischenmolekulare Wechselwirkungen eine mit Sicherheit nicht vernachlässigbare Rolle. Zum tieferen Verständnis der auftretenden Prozesse wird sowohl das Bleichverhalten, als auch die Intensitätswiederherstellung untersucht.



**Abbildung 83:** Typische Bleichkurve für mTagGFP in einem Hydrogel (20%, LAP, stehender Fokus). Der Laser wird bei  $t = 2.3\ \text{s}$  eingeschaltet, das Zeitintervall zwischen zwei Messpunkten beträgt  $5\ \text{ms}$ .

Das Bleichverhalten von mTagGFP zeigt einen biexponentiellen Zusammenhang. Somit setzt sich die Abnahme von fluoreszierenden Molekülen aus zwei sehr unterschiedlichen

schnellen Prozessen zusammen. Daher ist keine Bleichkinetik erster Ordnung festzustellen, wie sie aber für alle Modellgleichungen angenommen wird. Ist allerdings die Bleichdauer kurz genug, hier zum Beispiel unter einer Sekunde, so ist diese Annahme weiterhin gerechtfertigt. Die Bleichkurve zeigt zwei unterschiedlich schnelle Bleichprozesse. Gemäß der Behandlung des Photobleichens in Kapitel 2.5 könnte ein Prozess durch eine Multiphotonenabsorption mit  $n > 2$  und damit einer Photoreaktion oder sogar Photolyse zustande kommen und der andere zum Beispiel durch Reaktion im Triplettzustand in einen dunklen Zustand. Die Kurve zeigt auch, dass sehr lange Bleichzeiten nötig sind, um die Intensität der verbleibenden Fluorophore gegen null zu bekommen. Natürlich setzt bereits Diffusion als gegenläufiger Prozess während des Bleichens ein; der Diffusionsprozess spielt bei Hydrogelen auf dieser Zeitskala jedoch keine Rolle, wie später in diesem Abschnitt deutlich wird. Somit kann für praktikable Bleichdauern eine Bleichtiefe von 40-50% erreicht werden. Dies steht im Einklang mit veröffentlichten Daten, wo durch nicht vernachlässigbare Diffusion während des Bleichens sogar geringere Werte erreicht werden.[191,192] Der zeitliche Verlauf der Fluoreszenz in einem gebleichten Volumen ist in Abbildung 84 gezeigt. Er eignet sich hervorragend, um mehrere Prozesse diskutieren zu können.



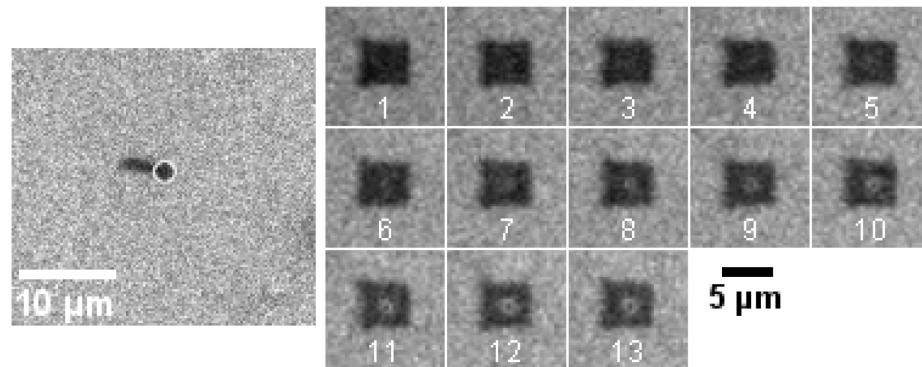
**Abbildung 84:** Bildabfolge eines FRAP-Experiments für ein mTagGFP HES-P(EG)<sub>6</sub>MA 30% Hydrogel. Die Zeitangaben beziehen sich auf das Ende des Bleichprozesses. Der dunkle Bereich hat einen Durchmesser von circa 5  $\mu\text{m}$ .



**Abbildung 85:** Hervorhebung der Kontur des Bleichquadrats aus Abbildung 84.

Es wird deutlich, dass die Intensität im Bleichquadrat nur sehr langsam mit der Zeit zunimmt; auch nach drei Stunden ist das gebleichte Volumen noch deutlich erkennbar. Außerdem ist festzustellen, dass sich das Bleichquadrat einige Mikrometer nach oben links verschiebt (das Bild zeigt eine Fläche von  $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ ). Trotz aktiver Schwingungsisolierung des Lasertisches und Arretierung des Mikroskoptisches sowie der Probe ist eine gewisse Bewegung während der Messung nie ganz auszuschließen. Das Hydrogel liegt auf einem Objektträger. Auf dem Gel ist das Deckgläschen angepresst und wird durch Klebefilm gehalten. Dadurch ist das Hydrogel zwar versiegelt und kann nicht durch Wasserverlust schrumpfen, jedoch steht durch diese Art der Präparation die Probe unter Spannung. Durch die gelartige Konsistenz der Probe besitzt diese außerdem eine geringe Steifigkeit und somit eine hohe Flexibilität. In diesem konkreten Fall hat sich die Probe in 3 h kontinuierlich um circa  $3.5 \mu\text{m}$  verschoben. Bei anderen Messungen kommt auch eine „sprunghafte“ Verschiebung der Probe vor, das heißt zwischen zwei Bildern auf einer Zeitskala von einigen Minuten. Eine laterale Verschiebung des Bleichquadrates ist insofern unproblematisch, als dass zur Bestimmung der Intensität im Bleichquadrat die Bereichsauswahl (*region of interest*, ROI) nachgestellt werden kann, solange sich das Bleichquadrat noch ganz im aufgenommenen Bereich befindet. Problematisch ist hingegen die Bewegung des Bleichquadrates in axialer Richtung, da sich in diesem Fall das Bleichquadrat aus der Fokalebene heraus bewegt. Geschieht dies kontinuierlich, so wird dadurch eine zu schnelle Diffusion in das gebleichte Volumen vorgetäuscht. Meistens passiert so etwas aber sprungweise, so dass der Prozess vom Experimentator bemerkt werden kann. Allerdings ist in solchen Fällen die Messung über mehrere Stunden unbrauchbar. Abhilfe schaffen kann eine automatische Fokustriftkompensation, wie sie von manchen Mikroskopherstellern bereits kommerziell angeboten wird. Ein weiteres Phänomen ist deutlicher in Abbildung 85 zu erkennen, wo durch einen Grafikfilter die Kanten hervorgehoben sind. Die Auswölbung oben links kommt durch den Startpunkt des Piezoscanners für den xy-Scan zustande und ist daher keine Anomalität. Im Laufe der Messung kommt aber eine weitere Auswölbung unten rechts hinzu. Hier wird eine dem Bleichquadrat angrenzende Tasche sichtbar, die auch Bestandteil des Bleichvolumens ist. Hier kann nicht gebleichtes GFP relativ ungehindert in das Bleichvolumen eindiffundieren. Zusätzlich ist noch die reguläre Diffusion aus den angrenzenden Bereichen durch Verschwimmen der Grenze zum Bleichvolumen erkennbar. In Abbildung 85 wird das durch das Verblässen der hervorgehobenen Kante deutlicher sichtbar als in Abbildung 84. Dieses Ergebnis untermauert die Vermutung, dass es im Hydrogel Kavitäten gibt, in denen eingeschlossene Moleküle relativ frei wie in Wasser diffundieren können. Die Diffusion in benachbarte Taschen hingegen verläuft sehr langsam. Es sei anzumerken, dass diese Taschen

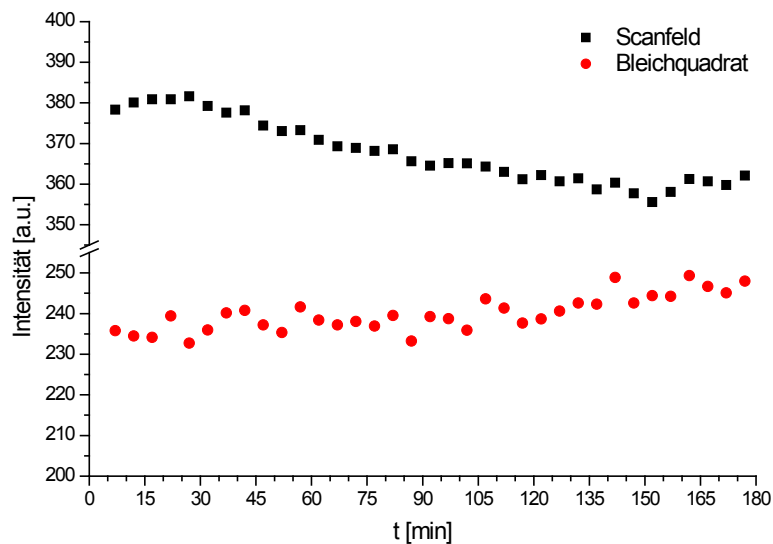
beim Präbleichscan nicht bemerkt werden; es ist eine homogene Verteilung der Intensität zu beobachten, da das GFP vor Beginn der Quervernetzung homogen in Lösung vorliegt.



**Abbildung 86:** Auftreten von schneller Diffusion innerhalb von Kavitäten. Aufnahme links circa eine Minute nach Bleichen, der weiße Kreis umrandet den gebleichten Bereich durch den Laserfokus, rechts beträgt der Abstand zwischen zwei Bildern 5 min.

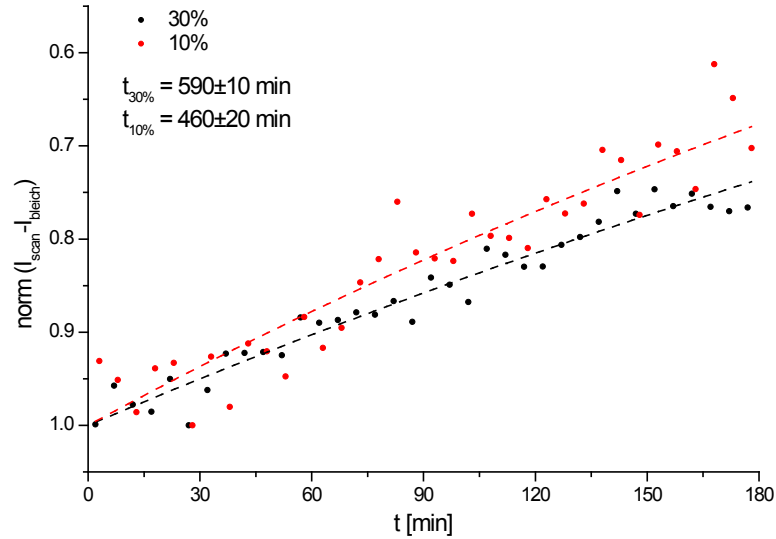
In Abbildung 86 links ist eine solche Kavität sehr deutlich zu erkennen. Das Bild ist kurz nach einem punktförmigem Bleichen aufgenommen. Hier ist bereits während des Bleichvorgangs GFP in das Fokalvolumen nachgeströmt und dort auch gebleicht worden. Das heißt, hier diffundiert das GFP vergleichbar schnell wie in Wasser mit einem Translationsdiffusionskoeffizienten von  $D_{\text{trans}} = 8.7 \cdot 10^1 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  nach Swaminathan *et al.* sowie Brown *et al.* [84,191] Rechts ist der gleiche Prozess mit umgekehrter Auswirkung zu beobachten. Hier scheint von oben oder unten GFP in einem Kanal in das gebleichte Volumen nachzufließen, so dass in den entsprechenden Pixeln die Intensität schnell wieder zunimmt. Im restlichen Bleichvolumen herrscht hingegen die dominierende sehr langsame Diffusion vor. Die Phänomene zeigen lokale Heterogenitäten im Hydrogel auf, spielen aber für das Diffusionsverhalten aufgrund ihrer räumlichen Begrenzung eine unwesentliche Rolle.

Insgesamt wirken sich aber sowohl der axiale Drift der Probe, als auch die Inhomogenitäten in Form von Taschen erschwerend auf die quantitative Analyse der FRAP-Messungen aus. Konkret sind solche Messungen unbrauchbar zur Bestimmung des Translationsdiffusionskoeffizienten. Aufgrund der langen Messzeit und der hohen Ausschussrate stehen daher nur wenige Bilderserien zur Verfügung. Für jedes Einzelbild wird ein ROI über das Bleichquadrat und ein ROI über den Bereich außerhalb gelegt und davon jeweils der Mittelwert der Intensität bestimmt. Das ist insofern notwendig, als dass durch die FRAP-Messung selbst auch Photobleichen in einem nicht zu vernachlässigenden Maße auftritt, wie in Abbildung 87 ersichtlich wird.



**Abbildung 87:** Beispielhafter zeitlicher Verlauf der Intensität in einem Bleichquadrat und im restlichen Scanfeld.

Wird die Intensität im Bleichvolumen in Relation zu der Intensität im nicht vorgebleichten Bereich gesetzt, so kann dieser systematische Fehler zumindest teilweise korrigiert werden. Wird die Messintensität zu gering gewählt, findet zwar kein signifikantes Bleichen mehr statt, dafür ergibt sich aber dann ein schlechteres Signal-Rausch-Verhältnis. Darüber hinaus spielt auch die Schwankung der Laserintensität eine Rolle, die gerade für Femtosekundenlaser nicht unerheblich ist. Der Hersteller Coherent gibt für den Mira 900-D eine Schwankung von 3% an. Durch die Zweiphotonenanregung potenziert sich die Intensitätsschwankung zu 6%. Die Schwankung der Laserintensität und Photobleichen kann durch Differenzbildung zur Intensität außerhalb des gebleichten Bereichs heraus gerechnet werden. Das auftretende Pixelrauschen ist nur durch längere Belichtungszeiten beziehungsweise höhere Laserleistung zu verringern, was aber stärkeres Photobleichen und damit eine stärkere Störung des FRAP-Prozesses zur Konsequenz hat, denn idealerweise sollte nach dem Bleichprozess kein weiteres Bleichen stattfinden. Alternativ ist auch die Mittelung über mehrere Einzelmessungen möglich, was sich aber bei solch langen Aufnahmedauern für eine Einzelmessung von selber ausschließt.



**Abbildung 88:** Zeitlicher Verlauf der normalisierten Differenz der Intensität im gesamten Scanbereich und innerhalb des Bleichquadrats für ein 10 und 30%iges HES-P(EG)<sub>6</sub>MA LAP Hydrogel mit mTagGFP. Eingetragen ist auch eine monoexponentielle Funktionsanpassung an die Daten als Leitlinie für das Auge.

Abbildung 88 zeigt den zeitlichen Verlauf der Abnahme der Bleichdifferenz für ein 10%iges und 30%iges HES-P(EG)<sub>6</sub>MA/DS0.048 Hydrogel. Es wurden Bleichtiefen von circa 25% für das 10%ige Hydrogel und 40% für das 30%ige Hydrogel erreicht. Eine Funktionsanpassung an die Daten nach Gleichung (2-39) gelingt nicht, da keine Konvergenz des iterativen Fitalgorithmus erreicht werden kann. Dies ist insofern nicht verwunderlich, als dass erstens die Datenpunkte verrauscht sind und zweitens das Messintervall viel zu kurz ist, obwohl bereits die Fluoreszenzerholung für drei Stunden aufgenommen wurde. Die Diffusion verläuft so langsam, dass zur vollständigen Beobachtung eine Messdauer von einem Tag adäquat wäre. Zur Verbesserung des Signal-Rausch Verhältnisses wäre darüber hinaus wie bereits erwähnt eine Mittelung über mehrere Einzelmessungen notwendig, die aber die Gesamtmesszeit um den entsprechenden Faktor weiter erhöht. Eine Vergrößerung der Bleichfläche zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses ist ausgeschlossen, weil dadurch die Fluoreszenzerholung im gebleichten Bereich noch langsamer verläuft; bei einer Punktbleichung sinkt hingegen das Signal-Rausch-Verhältnis. Es wurde versucht, die Daten an eine einfachere Modellgleichung anzupassen. Schnell *et al.* haben gezeigt, dass für ausreichend langsame Diffusion die aus einem stationären Laserstrahl entwickelte Gleichung (4-11) für kleine Bleichradien verwendet kann.[193]

$$\frac{F(t)}{F_{\infty}} = 1 - \frac{F_{\infty} - F(0)}{F_0 - F(0)} \cdot \left( 1 - \sum_{i=0}^{\infty} \frac{(-\beta)^i}{i!} \frac{1}{1 + i \left( 1 + \frac{16D \cdot t}{\omega_r^2} \right)} \frac{1}{\sqrt{1 + i \left( 1 + \frac{16D \cdot t}{\omega_z^2} \right)}} \right) \quad (4-11)$$

$\underset{R_{\text{mob}}}{\vee}$

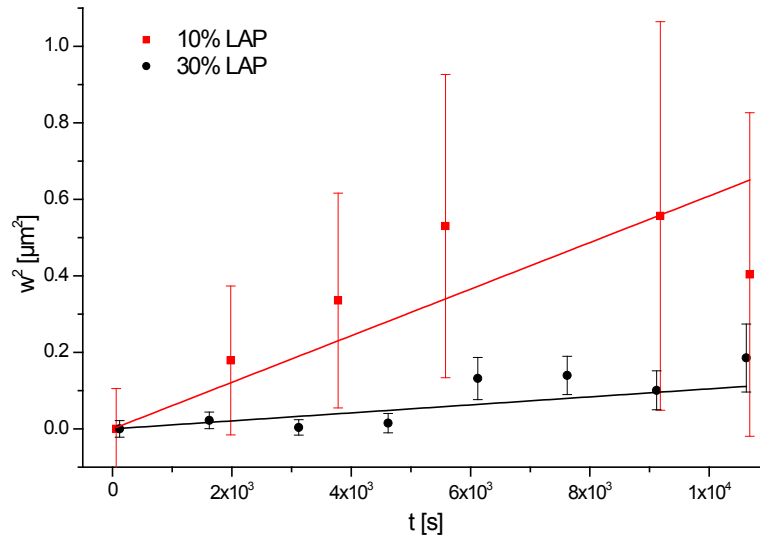
Jedoch gelingt auch für diese Gleichung keine Konvergenz der Funktionsanpassung. Außerdem ist die Kenntnis der Größe  $F_\infty$  nicht gegeben, da dafür die Messzeit deutlich verlängert werden müsste. Es darf nicht automatisch davon ausgegangen werden, dass die Intensität im gebleichten Volumen wieder auf den Ausgangswert zurück geht, da auch ein gewisser Prozentsatz an GFP-Molekülen vollkommen immobilisiert sein kann. Aus den vorhergehenden Anisotropiemessungen ist jedoch keine signifikante Immobilisierung zu erwarten. Um herauszufinden, ob sich die Messreihen prinzipiell quantitativ unterscheiden lassen, wird eine monoexponentielle Funktionsanpassung an den Daten vorgenommen. Die Fitfunktion hat keine physikalische Bedeutung, jedoch ist durch sie eine langsamere Diffusion für das 30%ige Hydrogel erkennbar. Die reine Betrachtung der Zeitkonstanten erlaubt zwar eine Unterscheidung der beiden Kurven mit 99%iger Sicherheit; allerdings würden bei Extrapolation die Konfidenzintervalle beider Funktionsanpassungen ineinanderlaufen. Das Messfenster von drei Stunden reicht nicht aus, um quantitative Vergleiche zwischen den Gelen zu vollziehen, da der FRAP-Prozess über einen viel längeren Zeitraum abläuft.

Da die komplexen, den FRAP-Prozess beschreibenden Modelle nicht angewendet werden können, wird trotzdem versucht, durch einige vereinfachende Annahmen eine Abschätzung des Translationsdiffusionskoeffizienten zu erhalten. Dabei wird das sich zeitlich verändernde Intensitätsprofil an der Grenzfläche von Bleichvolumen zum Volumen außerhalb betrachtet. Da für kleine Fluorophorkonzentrationen die Intensität direkt proportional zur Konzentration ist, ergibt sich daraus ein sigmoidales Konzentrations-Zeit-Profil. Die Differentiation der Kurve würde idealerweise eine Gaußkurve ergeben, deren Breite über die Ficksche Diffusionsgleichung mit dem Diffusionskoeffizienten zusammenhängt.

$$c(x,t) = \frac{A}{\sqrt{4\pi \cdot D_{\text{trans}} t}} \cdot e^{-\frac{x^2}{4D_{\text{trans}} t}} \xleftrightarrow{w^2 = 2D_{\text{trans}} t} c(x,t) = \frac{A}{w \sqrt{2\pi}} \cdot e^{-\frac{x^2}{2w^2}} \quad (4-12)$$

Es wird hierbei von isotroper dreidimensionaler Diffusion ausgegangen, die dann nur in einer Dimension betrachtet wird. Die aus einer Funktionsanpassung erhaltenen Breiten  $w$  werden quadriert in Relation zur Zeit  $t$  gesetzt. Dadurch ergibt sich ein linearer Zusammenhang mit der Steigung  $2 \cdot D_{\text{trans}}$ .





**Abbildung 89:** Gewichtete lineare Regression an der  $w^2$ - $t$ -Beziehung zur Bestimmung des Translationsdiffusionskoeffizienten für 10% beziehungsweise 30% HES-P(EG)<sub>6</sub>MA LAP Hydrogel mit mTagGFP. Beide Profilbreiten sind willkürlich bei  $t = 0$  auf Null gesetzt.

Die erhaltenen Translationsdiffusionskoeffizienten sind in Tabelle 18 ausgewählten Literaturwerten gegenübergestellt.

**Tabelle 18:** Diffusionskoeffizienten für mTagGFP in Hydrogelen und Vergleich mit Literaturwerten.

	$D_{\text{trans}}$ $\mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$	Referenz
<b>30% HES-P(EG)<sub>6</sub>MA LAP</b>	$0.5 \pm 0.2 \cdot 10^{-5}$	diese Arbeit
<b>10% HES-P(EG)<sub>6</sub>MA LAP</b>	$3.0 \pm 1.3 \cdot 10^{-5}$	diese Arbeit
<b>wt-GFP H<sub>2</sub>O</b>	$8.7 \pm 1.7 \cdot 10^{-1}$	Brown <i>et al.</i> [84]
<b>2 MDa FITC-Dextran in 10% PEG-Hydrogel</b>	$1 \pm 0 \cdot 10^{-1}$	Brandl <i>et al.</i> [48]
<b>IgG-FITC in 4% Galactosid-Hydrogel</b>	$3.3 \pm 1.5 \cdot 10^{-1}$	Markowitz <i>et al.</i> [194]

Der Vergleich mit der Literatur zeigt die äußerst erfolgreiche Immobilisierung des Proteins im Hydrogel. Während der Diffusionskoeffizient für ein 2 MDa FITC-Dextran in einem 10% PEG-Hydrogel bei  $10^{-1} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  liegt, ist er für das 26 kDa große mTagGFP vier Größenordnungen geringer. Die Diffusion von GFP im HES-P(EG)<sub>6</sub>MA Hydrogel ist in etwa sechs Größenordnungen langsamer als in Wasser. Selbst bei der schlechten Datenqualität und mehreren Vereinfachungen ist hier die Translationsdiffusion eindeutig sehr stark eingeschränkt und das GFP somit effektiv immobilisiert. Zur Abschätzung nehme man ein Mikropartikel mit 10  $\mu\text{m}$  Durchmesser. Ein GFP-Molekül bräuchte bei dem gemessenen Diffusionskoeffizienten in einem 10%igen Hydrogel knapp fünf Tage vom Zentrum bis an die

Oberfläche des Partikels. Unter der Annahme, dass der aus Fluoreszenzanisotropieuntersuchungen berechnete hydrodynamische Radius identisch für Translationsdiffusion ist, lässt sich die makroskopische Viskosität für die Hydrogele nach Gleichung (2-41) berechnen. Sie ergibt sich zu circa  $3 \cdot 10^6$  mPa·s für das 10%ige Hydrogel und  $18 \cdot 10^6$  mPa·s für das 30%ige Hydrogel. Diese Werte sind damit rund sechs Größenordnungen höher als die mikroskopische Viskosität (siehe Tabelle 15), die die GFP-Moleküle während der Rotationsdiffusion erfahren. Auch hierdurch manifestiert sich die Heterogenität des Hydrogels. Während die Moleküle relativ ungehindert in den Taschen des Polymernetzwerks rotieren können, ist ihre translatorische Beweglichkeit nahezu komplett gehindert.

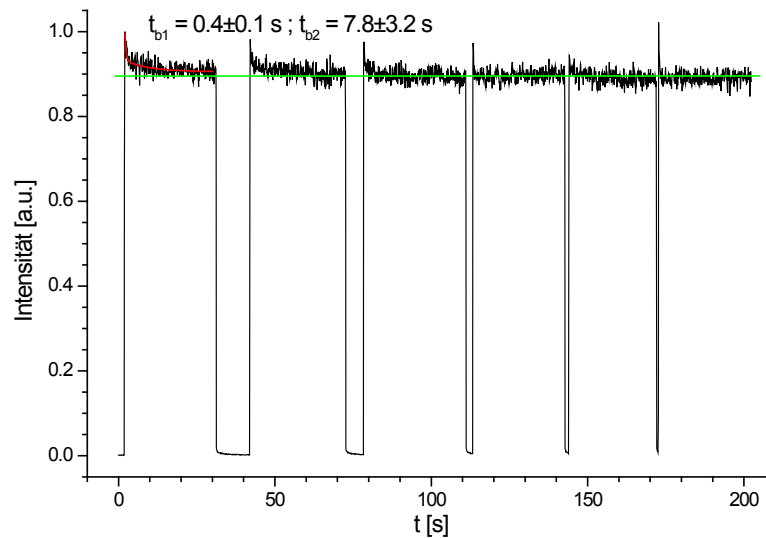
### *mTagGFP Referenzlösungen*

Wie bei den Anisotropieuntersuchungen sind auch für die FRAP-Experimente Polymerlösungen vermessen worden. Abgesehen von der nicht durchgeführten Quervernetzung sind die Proben unter identischen Bedingungen hergestellt und vermessen worden. Das Ergebnis eines Bleichscans ist in Abbildung 90 zu finden.



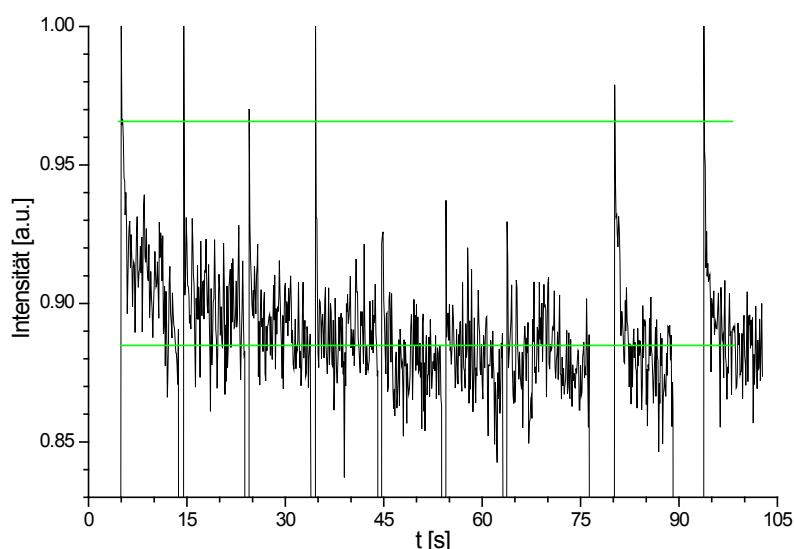
**Abbildung 90:** FRAP-Experiment für eine 30%ige HES-P(EG)<sub>6</sub>MA Polymerlösung mit mTagGFP mit identischen Parametern wie für die Hydrogele. Das linke Bild zeigt eine Fläche von  $30 \times 30 \mu\text{m}^2$ , mittig ist dieselbe Fläche nach dem Bleichscan zu sehen. Zum Vergleich ist rechts das Ergebnis für ein quervernetztes Gel zu sehen.

Auch nach mehrmaligen Versuchen konnte kein Bleichquadrat mit geringerer Intensität aufgenommen werden. Der Grund liegt darin, dass die Diffusion für die Proben sehr schnell stattfinden muss und aufgrund einer Verzögerung zwischen dem Ende des Bleichvorgangs und der Aufnahme des Bereichs etwa 45 s vergehen, so dass der FRAP-Prozess dann bereits vollendet ist. Eine schnelle Umschaltung von Bleichleistung auf Messleistung und eine schnelle Bildaufnahme in der Größenordnung von Millisekunden erreicht man nur durch eine elektronisch regelbare Abschwächung des Lasers (zum Beispiel Filterrad oder Pockelszelle) und durch ein Laserscanning-Mikroskop mit Kameradetektion. Da das FRAP-Prinzip auf diese Proben mit dem vorhandenen experimentellen Aufbau nicht angewendet werden kann, wird der Bleichvorgang sowie die Herstellung der ursprünglichen Intensität durch Aus- und Anschaltvorgänge untersucht. Dabei wird mit einem ortsfesten Laserfokus gearbeitet.



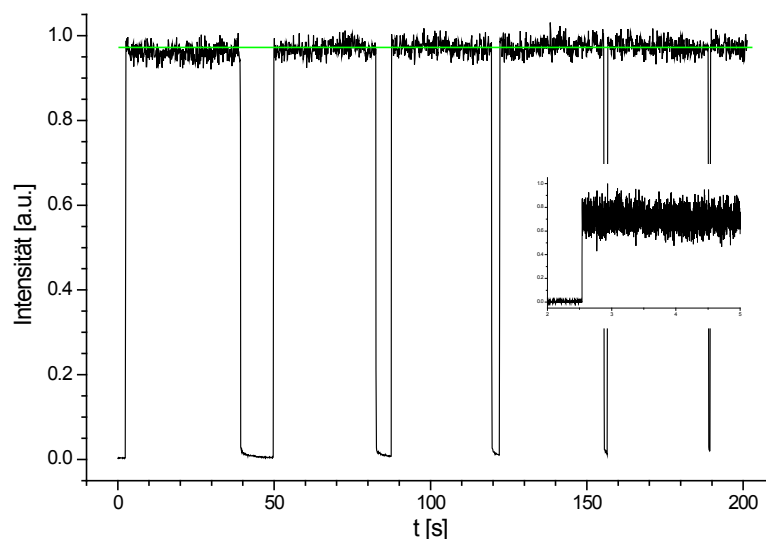
**Abbildung 91:** Intensitäts-Zeit-Kurve für eine 30%ige HES-P(EG)<sub>6</sub>MA Polymerlösung mit mTagGFP. Das Zeitintervall beträgt 100 ms. Die rote Linie zeigt die biexponentielle Funktionsanpassung an einen Teil der Daten, die grüne horizontale Linie dient als Orientierungshilfe. Die Unterbrechungen sind von links nach rechts 10, 5, 2, 1 und 0.5 s lang.

Es ist erkennbar, dass der Bleichvorgang auch in der Polymerlösung aufgenommen werden kann. Eine biexponentielle Funktionsanpassung an den ersten Bleichabschnitt liefert sehr ähnliche Bleichkonstanten wie für den Bleichvorgang in Abbildung 83. Dies ist konsistent, da es sich in beiden Fällen um dasselbe Fluorophor und sehr ähnliche Mikroumgebungen handelt, also werden die gleichen Bleichprozesse ablaufen. Die Intensitätskurve läuft sehr schnell auf einen konstanten Wert zu, der bei etwa 90% der Anfangsintensität liegt. Es liegt dann ein Gleichgewicht vor, in dem gebleichte Moleküle in derselben Rate erzeugt werden wie neue Moleküle in den Laserfokus eindiffundieren. Im 30%igen Hydrogel kann hingegen eine Bleichtiefe von 45% erreicht werden. Daher ist für die Polymerlösungen von einer recht ungehinderten Diffusion auszugehen, in Hydrogelen hingegen ist die Diffusion wie gezeigt stark durch die Quervernetzung eingeschränkt. Durch Blocken des Lasers für das in Abbildung 91 gezeigte Experiment wird das Bleichen unterbrochen. Nach 10 s Unterbrechung ist die Ausgangsintensität fast wiederhergestellt, bei Unterbrechungen von 2 s oder weniger ist nur eine geringe Intensitätserholung feststellbar. Demzufolge ist die Diffusion in den Polymerlösungen um einige Größenordnungen geringer als in Wasser, wo die Ausgangsintensität bereits nach gut 1 ms erreicht wird.[84] Um zu klären, ob die Fluoreszenzintensität vollständig wiederhergestellt wird, wird das Bleichexperiment mit Unterbrechungen in ansteigender Länge wiederholt.

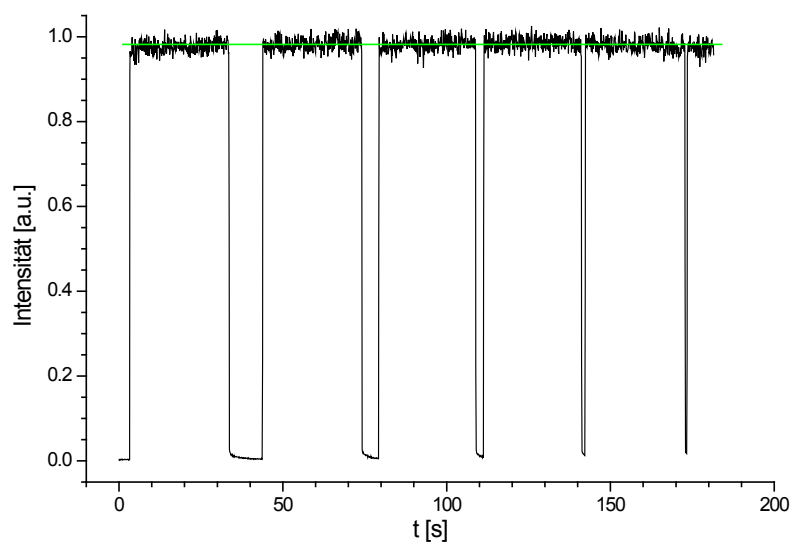


**Abbildung 92:** Intensitäts-Zeit-Kurve für eine 30%ige HES-P(EG)<sub>6</sub>MA Polymerlösung mit mTagGFP. Das Zeitintervall beträgt 100 ms. Die grünen horizontalen Linien dienen als Orientierungshilfe. Die Unterbrechungen betragen 0.5-1 s, die beiden rechten 10 s.

In Abbildung 92 ist deutlich der Bleichprozess so wie in Abbildung 91 durch Abnahme der Fluoreszenzintensität erkennbar. Während bei den kurzen Bleichunterbrechungen mit einer Dauer von 0.5-1 s keine signifikante Fluoreszenzerholung sichtbar ist, ist nach den 10 s dauernden Unterbrechungen die Ausgangsfluoreszenz komplett wiederhergestellt. Das Bleichverhalten einer 20%igen Lösung desselben Polymers zeigt hingegen nicht diese Charakteristika (Abbildung 93). Nach Einschalten des Lasers mit Bleichintensität kann keine Abnahme des Fluoreszenzsignals beobachtet werden. Die Diffusion ist hier bereits so schnell, dass selbst bei 1 ms Zeitauflösung ein konstantes Signal aufgenommen wird (kleiner aufgesetzter Graph). Selbiges Verhalten wird auch in Pufferlösung (Abbildung 94) beobachtet. Dies ist der geringeren Viskosität der Lösungen zuzuschreiben, welche über Gleichung (2-41) invers mit dem Diffusionskoeffizienten zusammenhängt und daher auch eine merklich schnellere Diffusion von nicht gebleichten Molekülen zulässt.

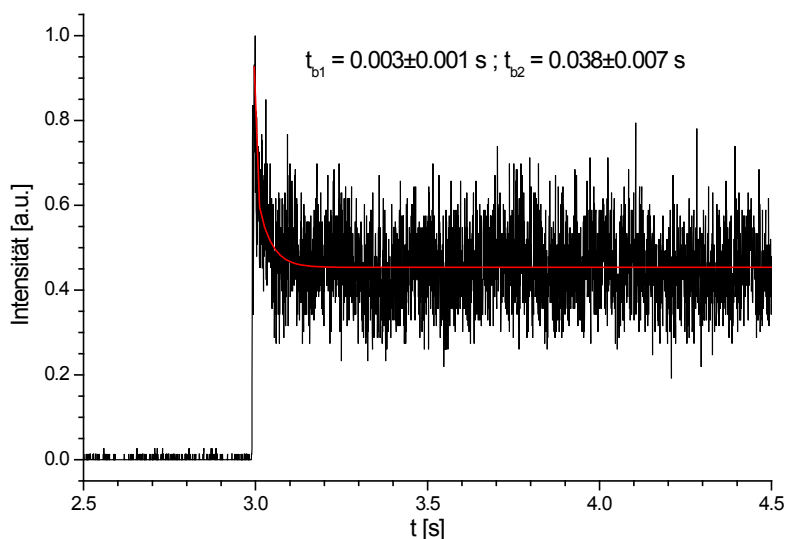


**Abbildung 93:** Intensitäts-Zeit-Kurve für eine 20%ige HES-P(EG)<sub>6</sub>MA Polymerlösung mit mTagGFP. Das Zeitintervall beträgt 100 ms. Die grüne horizontale Linie dient als Orientierungshilfe. Der aufgesetzte kleine Graph zeigt einen Ausschnitt mit 1 ms Zeitauflösung.



**Abbildung 94:** Intensitäts-Zeit-Kurve für mTagGFP in Pufferlösung (PBS). Das Zeitintervall beträgt 100 ms. Die grüne horizontale Linie dient als Orientierungshilfe.

Abschließend sei noch der Vergleich mit einer 50%igen Saccharose-Wasser Lösung hergestellt, die eine Viskosität von  $15.4 \text{ mPa}\cdot\text{s}^{-1}$  besitzt.



**Abbildung 95:** Intensitäts-Zeit-Kurve für mTagGFP in einer 50%igen Saccharoselösung. Das Zeitintervall beträgt 5ms. Die rote Linie zeigt eine biexponentielle Funktionsanpassung an die Daten.

Auch hier zeigt sich wie bei den Hydrogelen die typische Bleichkinetik mit zwei simultan laufenden Bleichprozessen. Diese laufen jedoch deutlich schneller als im Hydrogel ab, was mit der unterschiedlichen Mikroumgebung begründet werden könnte. Dennoch ist auch bei einer Probe mit derart hoher Viskosität die Ausgangsintensität wieder hergestellt, bevor die FRAP-Messung gestartet werden kann.

Insgesamt zeigt sich, dass die durch die Fluoreszenzanisotropie gemessene erhöhte Viskosität relativ zu Wasser nur zu einem geringen Teil die Translationsdiffusion des GFP beeinflusst. Selbst in einer hochviskosen Zuckerlösung verläuft die Diffusion um Größenordnungen schneller ab als in den Hydrogelen, deren Rotationsviskosität für GFP zum Teil deutlich geringer ist. Daher kann nur die Quervernetzung im Hydrogel für die stark gehinderte Diffusion in Größenordnungen von Mikrometern dafür verantwortlich sein. Die erhaltenen Ergebnisse demonstrieren den erfolgreichen Einschluss des GFP in das Polymernetzwerk. Eine vergleichbar schnelle Freisetzung des Proteins kann daher nur durch den Abbau des Hydrogels erfolgen, so dass für dieses Polymer eine kontrollierte Freisetzung über Einstellung der Gelparameter möglich ist.

## Kapitel 5      ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

In dieser Arbeit wurde die Möglichkeit der Untersuchung von polymeren Systemen durch zeitaufgelöste Zweiphotonen-Fluoreszenzmikroskopie gezeigt. Dabei werden die Proben dreidimensional orts aufgelöst untersucht und durch die Zeitauflösung aus Fluoreszenz- und Anisotropiezerfall werden zusätzliche Informationen über die Probe erhalten. Die eingesetzten Fluorophore sind sehr empfindliche molekulare Sensoren, die im Falle der Aminfarbstoffe chemisch spezifisch sind und dabei auch Reporter ihrer molekularen Umgebung sind. Für die Untersuchung von Polymeroberflächen wurden die fluorogenen Farbstoffe Fluorescamin, NBD-F und NDA sowie Sulforhodamin 101 verwendet, für die Untersuchung von Hydrogelen neben Cumarin 314 vor allem das grün-fluoreszierende Protein GFP.

### *Dreidimensionale Darstellung von Aminogruppen auf plasmabehandelten Polymeroberflächen*

Durch die Zweiphotonen-Fluoreszenzmikroskopie ist eine orts aufgelöste Detektion von Aminogruppen mit einer Auflösungsgrenze von wenigen hundert Nanometern möglich. Im Rahmen der von der VolkswagenStiftung geförderten Projekte „Microstructured Surface Treatment by Atmospheric-Pressure Microplasmas“ und „Plasma Printing of Thin Films with Porous Metal Electrodes – P<sup>3</sup>M“ wurden unterschiedliche Substrate von Frau Hinze am Institut für Oberflächentechnik der TU Braunschweig ortsselektiv plasmabehandelt. Die Untersuchungen von BOPP-Folien haben ergeben, dass die Aminierung innerhalb eines Spots nur geringe Inhomogenitäten aufweist, so dass insgesamt von einer erfolgreich homogenen Behandlung gesprochen werden kann. Da die Behandlungstiefe der Polymeroberfläche unterhalb der Auflösungsgrenze des Mikroskops liegt, können hierüber keine Aussagen getroffen werden. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die BOPP-Oberfläche eine gewisse Rauigkeit in der Größenordnung von circa einem Mikrometer besitzt, welche durch die Zweiphotonen-Mikroskopie aufgelöst werden kann. Durch Variation der Plasmabehandlungszeit von BOPP mit porösen Metallelektroden lassen sich sehr hohe Aminogruppendichten erzeugen, ohne jedoch die Rauigkeit der Probe zu erhöhen. Aufgrund der nasschemischen Fluoreszenzmarkierung der Aminogruppen werden kurzkettige Fragmente (LMWOM), die durch die Plasmabehandlung erzeugt werden, abgewaschen und nicht erfasst. Eine quantitative Fluoreszenzanalyse des Eluats bei der Fluoreszenzmarkierung könnte Aufschluss über die Menge an Aminogruppen auf dem LMWOM ergeben.

Die Untersuchung von elektrisch leitenden PP/C-Kompositen ist aufgrund der starken Absorption der Anregungsstrahlung nicht durch Zweiphotonenmikroskopie möglich. Hierzu wurde der experimentelle Aufbau dahingehend verändert, dass eine zeitaufgelöste Fluoreszenzdetektion durch Einphotonen-Weitfeldanregung möglich wurde. In diesem Verfahren kann die Probe nur zweidimensional untersucht werden, was aber aufgrund einer Behandlungstiefe unterhalb der optischen Auflösungsgrenze keinen gravierenden Informationsverlust mit sich bringt. In grundlegenden Untersuchungen wurde hier außerdem gezeigt, dass innerhalb eines Spots das an die Aminogruppen gebundene Fluorophor in unterschiedlichen Mikroumgebungen vorliegt. Dies drückt sich in einer Variation der Fluoreszenzlebensdauer aus. Um die Fluoreszenzintensität pixelweise in direkte Relation zur Konzentration setzen zu können, reicht für eine genaue Untersuchung der Probe die Bestimmung der integralen Intensität nicht aus. Nur durch zeitaufgelöste Messungen kann zuverlässig die Konzentration der Moleküle bestimmt werden, da die Proportionalität von Anfangsintensität zur Konzentration immer gültig ist.

Die wahre Stärke der Zweiphotonenmikroskopie zeigte sich erst bei der Untersuchung von komplexen, dreidimensional behandelten Proben. Die Plasmabehandlung von Fasern ermöglicht die Modifikation der Oberflächeneigenschaften, ohne dabei die Bulk-Eigenschaften der Fasern zu verändern. Ein wichtiges Kriterium ist dabei die gleichmäßige und komplette Behandlung der aus vielen Filamenten bestehenden Fäden. Die Verteilung der Aminogruppendichten auf einzelnen Filamenten einer Faser kann dreidimensional untersucht und dargestellt werden, wobei das Signal nicht nur direkt von der Oberfläche, sondern auch aus dem Inneren der Filamente räumlich aufgelöst wird. Das aus mehreren 2D-Bildern zusammengesetzte 3D-Fluoreszenzbild erlaubt die Betrachtung des Fadens aus beliebigen Perspektiven und Schnittebenen. In Zusammenarbeit mit Herrn Baranski vom Fraunhofer IST in Braunschweig wurden plasma-aminierter PET- und Baumwollfasern untersucht. Für beide Proben konnte eine erfolgreiche Aminierung der Filamentoberfläche nachgewiesen werden. Im Falle der PET-Faser erniedrigte jedoch signifikante Eigenfluoreszenz des PET den Kontrast; bei den Baumwollfasern wurde auch Eigenfluoreszenz beobachtet, die jedoch deutlich geringer ausfiel. Falls es zukünftig erforderlich sein sollte, dann ließe sich durch langwelligere Anregung und Auswahl eines langwellig fluoreszierenden Farbstoffs die Hintergrundfluoreszenz minimieren und der Kontrast zu den fluoreszenzmarkierten Aminogruppen erhöhen. Das Hauptaugenmerk bei den Untersuchungen lag darauf, die Plasmabehandlung der Filamente für alle Positionen im 500  $\mu\text{m}$  dicken Faden nachzuweisen. Durch den relativ kleinen Arbeitsabstand von den für die effektive Zweiphotonenanregung benötigten Objektive hoher numerischer Apertur und aufgrund von Streueffekten ist es



praktikabel, den Faden von oben und unten zu untersuchen, so dass eine Eindringtiefe des Laserstrahls in die Probe von nur noch 250  $\mu\text{m}$  notwendig ist. In den erfolgten Untersuchungen konnten Filamentstrukturen in einer Tiefe von 180  $\mu\text{m}$  noch deutlich aufgelöst werden. Allerdings konnte durch die Eigenfluoreszenz der PET-Probe und die mit der Eindringtiefe abnehmende Tiefenschärfe die detektierte Fluoreszenz nicht mehr eindeutig der Fluoreszenzmarkierung der Aminogruppen zugeordnet werden. Verbesserungen können aber auch hier durch Verwendung längerer Anregungswellenlängen erzielt werden.

Im Rahmen der oben genannten Projekte wurden neben BOPP-Folien und PP/C-Kompositen auch PP-Membrane ortsselektiv funktionalisiert und untersucht. Durch ihre poröse Struktur erlauben sie grundlegende Untersuchungen, die über die erzielbaren Ergebnisse mit kompakten Polymerfolien hinausgehen. Im Gegensatz zu BOPP-Folien können für die PP-Membrane Plasmafunktionalisierungen bis zu einer Tiefe von mehr als 10  $\mu\text{m}$  unterhalb der äußeren Oberfläche nachgewiesen werden. Die Behandlungstiefen liegen deutlich über der Auflösungsgrenze des Objektivs, so dass hier Intensitätstiefenprofile aufgenommen werden konnten. Über eine ausreichende große Fläche gemittelt zeigt das Tiefenprofil ein exponentielles Abklingverhalten, wodurch mittels Funktionsanpassung an die Profile eine objektive Quantifizierung der Behandlungstiefe möglich ist. Die Eindringtiefen für die Plasmabehandlung auf den topographisch unterschiedlichen Membranober- und unterseiten sowie die Verwendung einer zusätzlichen BOPP-Folie als Dielektrikum während der Plasmabehandlung zeigen im Vergleich keine signifikanten Unterschiede. Darüber hinaus konnten durch die dreidimensionale Untersuchung Entladungen in Mikrokanälen aufgenommen werden, deren Existenz interessant ist bei der grundlegenden Aufklärung der im Plasma stattfindenden Mechanismen und beteiligten Spezies sowie der Interaktion dieser Spezies mit den Substraten. Solche Mikrokanäle können durch eine reine Oberflächenuntersuchung nicht beobachtet werden. Weiterhin konnten erfolgreich Aminogruppen in unterschiedlicher Mikroumgebung identifiziert werden. Während bei den PP/C-Kompositen die Fluoreszenzlebensdauer als Indikator für unterschiedliche Mikroumgebungen genutzt wurde, konnte über die Fluoreszenzanisotropie das Rotationsverhalten der Farbstoffmoleküle untersucht werden. Dazu wurde die mittlere Anisotropie der Farbstoffmoleküle ortsaufgelöst dargestellt. So gibt es Aminogruppen nahe der äußeren Oberfläche, an denen die angebundenen Farbstoffmoleküle relativ ungehindert rotieren können, während an anderen Aminogruppen die Farbstoffmoleküle eine starke Rotationshinderung durch ihre Mikroumgebung erfahren. Vor allem nimmt die Rotationshinderung mit der Behandlungstiefe zu. Dies ist ein weiteres Indiz für die These, dass vor allem metastabile Spezies wie  $\text{N}^4(\text{S})$  und  $\text{N}_2(\text{A})$  an der Entstehung von Aminogruppen auf der Polymeroberfläche beteiligt sind und diese auch in kleine Poren mit

einer Größe unterhalb der lateralen Auflösungsgrenze des Mikroskops von etwa  $0.2\ \mu\text{m}$  eindringen und Aminogruppen hervorbringen können.

Ein wichtiges Ziel der von der VolkswagenStiftung geförderten Projekte war die Unterscheidung von primären und sekundären Aminen auf Polymeroberflächen. Als geeigneter Farbstoff wurde anfangs NBD-F ausgewählt, da er an beide Aminosorten bindet und seine photophysikalischen Eigenschaften sensitiv gegenüber dem gebundenen Amin sind. Allerdings zeigt sich, dass der Farbstoff auch sehr sensitiv gegenüber Parametern der Mikroumgebung ist. So konnten schlussendlich primäre und sekundäre Amine in Paraffin als unpolare, viskose Modellsubstanz für Polymeroberflächen durch unterschiedliche Fluoreszenzlebensdauern beziehungsweise Rotationskorrelationszeiten unterschieden werden, auf Polymeroberflächen gelang dies jedoch nicht. Daher wurde dazu übergegangen, die beiden Aminosorten durch zwei Farbstoffe separat zu markieren, die sich durch ihr Fluoreszenzspektrum gut voneinander trennen lassen. Nach grundlegender Recherche wurde NDA als Farbstoff für primäre Amine ausgewählt; es fluoresziert im blauen Wellenlängenbereich und reagiert ausschließlich mit primären Aminen. Dadurch können in einem zweiten Reaktionsschritt die sekundären Amine mit Sulforhodamin 101 markiert werden; ein im roten Wellenlängenbereich fluoreszierender Farbstoff mit hoher Helligkeit und guter Stabilität. Erfolgreich konnten die beiden Aminosorten auf PP-Membranen simultan angeregt und detektiert werden. Der Erfolg der Amindiskriminierung konnte außerdem dadurch manifestiert werden, dass einige Mikrokanäle nur primäre Amine enthielten, während im gleichen Bild andere Mikrokanäle beide Aminosorten enthielten. Darüber hinaus wurde durch eine Kalibrierung mittels Referenzlösung des Farbstoffs in Lösung beziehungsweise auf Polypropylen den Intensitätswerten für primäre und sekundäre Amine eine absolute Konzentration zugeordnet. Dabei erweist es sich als überaus hilfreich, neben der Intensität auch die Fluoreszenzlebensdauer zu bestimmen, um dadurch Unterschiede in der Fluoreszenzquantenausbeute durch unterschiedliche Mikroumgebungen zu korrigieren. Dadurch eignen sich auch Farbstofflösungen als Referenzlösungen, obwohl diese eine deutlich andere Mikroumgebung als die Farbstoffmoleküle auf der Polymeroberfläche besitzen. Durch diese Quantifizierung ist es möglich, primäre und sekundäre Amine in ihrer lokalen absoluten Konzentration dreidimensional orts aufgelöst in Submikrometerauflösung zu detektieren. Nach bestem Wissen des Autors ist dies mit keiner anderen Analysemethode gelungen.

Da die absolute Quantifizierung experimentell aufwendig ist, wurde sie bisher nur an einer PP-Membran zur Demonstration der Durchführbarkeit der Methode gezeigt. Für die Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer auf der Polymeroberfläche wurde bisher nur ein Mittelwert

über alle Pixel benutzt. In Zukunft kann durch pixelgenaue Analyse der Fluoreszenzlebensdauer die Genauigkeit dieser Methode noch verbessert werden. Natürlich ist ein Transfer auch auf andere Substrate möglich und soll in naher Zukunft auch durchgeführt werden. Desweiteren ist der Vergleich mit anderen Analysemethoden zur Bestimmung der Amino-gruppendichte beziehungsweise -konzentration wichtig. Hierzu wurden vom Projektpartner am IOT bereits ATR-FTIR und REM-EDX als etablierte Methoden angewendet. Daneben soll auch die Untersuchung der Fluoreszenzanisotropie von Farbstoffmolekülen auf Polymeroberflächen weiter verfolgt werden. Dafür ist es erstrebenswert, die Rotationskorrelationszeit anstelle der mittleren Anisotropie orts aufgelöst darzustellen, da diese unabhängig von der nicht konstanten Fluoreszenzlebensdauer ist. Allerdings werden hierfür deutlich höhere Intensitätswerte benötigt, da anstelle der integralen Intensitäten zeitaufgelöste Intensitäten miteinander verrechnet werden müssen.

Aus den in Rahmen der oben genannten Projekte gewonnen Erkenntnissen der dreidimensionalen Fluoreszenzanalyse heraus wurden plasmabehandelte P(A)ES-PVP Hohlfasermembrane der Firma Gambro untersucht. Da sich für dieses Substrat viele Analogien zu den extensiv untersuchten PP-Membranen ergeben, konnte bereits nach erstmaliger fluoreszenzmikroskopischer Untersuchung verwertbare Ergebnisse erzielt werden. Die nähere Untersuchung verschiedener Fragestellungen wird in Zukunft im Rahmen einer Kooperation weitergeführt.

#### *Charakterisierung von Hydrogelen mittels Sensormolekülen*

Im Rahmen des SFB 578 „Vom Gen zum Produkt“ wurde im Projektbereich D1 „Drug Delivery Systeme für die kontrollierte Proteinfreisetzung“ GFP in Hydrogele inkorporiert und dessen Rotations- und Translationsdiffusionsverhalten untersucht. Die Aufgabe des DDS ist es, empfindliche Antikörper vor äußeren Einflüssen wie dem enzymatischen Abbau zu schützen und über einen langen Zeitraum kontrolliert und definiert freizusetzen. In klassischen Freisetzungsexperimenten wird die Freisetzung eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers über Zeiträume von bis zu einem Jahr oder länger beobachtet. Im Gegensatz dazu lassen sich durch Anisotropie- und FRAP-Experimente weitaus detaillierte Aussagen in wesentlich kürzerer Zeit treffen. GFP eignet sich dahingehend besonders, als dass die Interaktion mit dem Hydrogel aufgrund seiner chemischen Ähnlichkeit zu Antikörpern sehr gut vergleichbar ist. Im Gegensatz zu fluoreszenzmarkierten Antikörper besitzt GFP eine einzelne, klar definierte und lokalisierte chromophore Gruppe im Inneren des Protein  $\beta$ -Fass. Dies ist äußerst wichtig, um Fluoreszenzanisotropiemessungen zur Untersuchung des Rotationsverhaltens der Proteine eindeutig auswerten zu können. Durch Kombination mit FRAP-Messungen ist das Trans-

lationsdiffusionsverhalten von GFP im Hydrogel zugänglich. Somit sind die beiden Analysemethoden komplementär. Sie zeichnen sich dadurch aus, dass mit nur einer Probe, einem Sensormolekül und einem Messaufbau beide Parameter hintereinander bestimmt werden können. Dies ist nach bestem Wissen des Autors mit keiner anderen Kombination von Fluoreszenzanalysemethoden möglich.

Die Fluoreszenzanisotropieuntersuchungen haben ergeben, dass das eingeschlossene GFP relativ frei beweglich im Hydrogel beweglich ist. Adsorptionseffekte sind aufgrund der Ergebnisse nicht zu erwarten oder haben einen verschwindend geringen Anteil. Eine Verlangsamung der Rotationsdiffusion ist vor allem der Viskositätszunahme durch den Polymeranteil im Hydrogel in Relation zu Wasser zuzuschreiben. Der Grad der Quervernetzung oder Länge der quervernetzenden Seitenketten hat in den untersuchten Bereichen keinen Einfluss auf die Rotationsdiffusion. Durch Vermessung von Saccharose-Referenzlösungen gelingt eine Abschätzung der Mikroviskosität im Hydrogel, die für die Verlangsamung der Rotationsdiffusion im Hydrogel verantwortlich ist. Neben Hydrogelscheiben wurden auch Mikropartikel untersucht. Die Fluoreszenz des GFP in den Mikropartikeln wurde erfolgreich bildgebend dargestellt. Die Fluoreszenzanisotropiekurven für die Mikropartikel sind erwartungsgemäß den Kurven für die Hydrogele sehr ähnlich. Darüber hinaus konnte durch Kurvenvergleich gezeigt werden, dass bei der Mikropartikelherstellung eine Anreicherung des Polymers in der wässrigen Phase erfolgt.

Um quantitativ zuverlässige Aussagen zu erhalten, muss das Problem des unbekannten Hintergrundbeitrags gelöst werden. Dies kann einerseits durch eine geeignete Hintergrundkorrektur oder nach der Messung durch Anwendung einer Fitroutine erfolgen, die den Hintergrundbeitrag von den Messdaten eliminiert. Es sei aber darauf hingewiesen, dass nichtsdestotrotz alle qualitativen Aussagen über die Rotationsdiffusion von GFP ihre Gültigkeit bewahren sowie auch die quantitativen Vergleiche zwischen Hydrogelen und Referenzlösungen. Die absoluten quantitativen Werte könnten dadurch aber mit höherer Zuverlässigkeit bestimmt werden.

Desweiteren soll in Zukunft auch die Fluoreszenzanisotropie von Zielmolekülen, im speziellen IgG-Antikörpern untersucht werden. Aufgrund der zu erwartenden sehr langsamen Rotation dieser großen Moleküle (144 kDa im Vergleich zu 27 kDa für GFP) im Hydrogel mit Rotationskorrelationszeiten von  $>100$  ns eignen sich nur wenige Farbstoffe zur Fluoreszenzmarkierung. Ein geeigneter Kandidat ist Pyren. Zusammen mit einer niedrigeren Pulswiederholrate, realisiert durch einen Cavity Dumper, wären so auch sehr langsame Fluoreszenzdepolarisationen detektierbar. Allerdings erschweren die lokale Rotation der

Markierungsmoleküle und unbekannte Bindungsverhältnisse am Antikörper die Analyse. Daher wäre es wichtig zu zeigen, dass die mit GFP erzielten Ergebnisse auch auf größere Antikörper übertragbar sind und somit weitere Untersuchungen mit GFP durchgeführt werden können.

Durch die FRAP-Messungen wurde die erfolgreiche Immobilisierung des GFP in den Maschen des Hydrogels nachgewiesen. Auf einer Mikrometerskala findet eine nur noch schwer zu beobachtende Diffusion statt. Dadurch ergeben sich Schwierigkeiten bei der Berechnung des Translationsdiffusionskoeffizienten über die Funktionsanpassung an die FRAP-Kurve. Eine Aufnahmedauer des Diffusionsprozesses über drei Stunden reichte nicht aus, um eine erfolgreiche Funktionsanpassung an die in der Literatur vorgestellten Modellgleichungen vorzunehmen. Eine Abschätzung der Größenordnung des Translationsdiffusionskoeffizienten wurde über eine alternative Methode vorgenommen, bei der die Verbreiterung der Kante zwischen gebleichtem und ungebleichtem Bereich in der Probe über die Zeit analysiert wurde. Hierdurch konnte erfolgreich gezeigt werden, dass der Diffusionskoeffizient für die Translation mehrere Größenordnungen unter denen von vergleichbaren, in der Literatur angegebenen Systemen liegt, was für eine sehr effektive Immobilisierung der Moleküle im Hydrogel spricht. Desweiteren konnte auch eine Korrelation von Diffusionskoeffizient und Polymergehalt des Hydrogels gezeigt werden. Nicht durchgeführt wurde die Untersuchung des Einfluss der Quervernetzung. Beim Vergleich von Hydrogelen und unvernetzten Polymerlösungen gleichen Polymergehalts konnte deutlich gemacht werden, dass die Immobilisierung praktisch ausschließlich durch die Quervernetzung zustande kommt. Daher ist eine genauere Untersuchung dieses Gelparameters lohnenswert.

Da bereits mit GFP eine effektive Immobilisierung im Hydrogel nachgewiesen werden konnte, wird diese für einen IgG-Antikörper mindestens genauso deutlich ausfallen. Nichtsdestotrotz würde ein exemplarisches FRAP-Experiment diese Behauptung beweisen. Da für FRAP keine Zeitauflösung auf einer molekularen Zeitskala notwendig ist, ist die Wahl des Markierungsfarbstoffs unkritisch, so dass hier zum Beispiel das für FRAP-Messungen häufig verwendete FITC zum Einsatz kommen könnte.

Zukünftige Anisotropie und FRAP-Messungen könnten bei 37 °C durchgeführt werden, um das Verhalten der eingeschlossenen Moleküle bei Körpertemperatur zu untersuchen. Zwar ist bei Kenntnis aller Größen in Gleichung (2-31) und (2-41) die Berechnung der Rotations- und Translationsdiffusionskoeffizienten bei 37 °C ohne weiteres möglich, jedoch bleiben hierdurch eventuelle nicht bekannte Einflussfaktoren des komplexen Hydrogelsystems unberücksichtigt. Der nur unwesentlich experimentell höhere Aufwand wäre dadurch gerech-

fertigt. Weiteren Aufschluss über die Wechselwirkung der eingeschlossenen Moleküle im Hydrogel mit der Polymermatrix könnte die Bestimmung der Mikroviskosität durch eine niedermolekulare fluoreszierende Viskositätssonde ergeben.[195,196] Die aus diesem Experiment erhaltene Viskosität ließe sich mit der Viskosität aus FRAP-Messungen vergleichen und somit Aufschluss über die Diffusion innerhalb einer Masche und zwischen Maschen erhalten, was zu einer besseren Charakterisierung des Hydrogels auf molekularer Ebene beitrüge.

Abschließend lässt sich resümieren, dass durch diese Arbeit die Zweiphotonen-Fluoreszenzmikroskopie erfolgreich zur Analyse von komplexen polymeren Systemen wie der 3D-Bestimmung von Aminogruppendichten und der Charakterisierung von Hydrogelen angewendet wurde.

## Kapitel 6 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Bryson, B. *A short history of nearly everything* **2003**, Broadway Books, New York, NY. ISBN: 0767908171
- [2] Hooke, R. *Micrographia: or, Some physiological descriptions of minute bodies made by magnifying glasses* **1665**, J. Martyn and J. Allestry, London.
- [3] Leewenhoek, M.; Graaf, R. de *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **1673**, 8(92-100), 6037–6038. DOI: 10.1098/rstl.1673.0017
- [4] Hecht, E. *Optik* **2005**, Oldenbourg, München. ISBN: 3486273590
- [5] Hoffmann D. *Lexikon der bedeutenden Naturwissenschaftler. In drei Bänden* **2003**, Spektrum Akad. Verl, Heidelberg, Berlin. ISBN: 3827403162
- [6] Heuss, T. *Neue Deutsche Biographie (NDB). Abbe, Ernst Carl* **1953**, Duncker & Humblot, Berlin.
- [7] Rusk, N. (1911, 1929, 1967) *First fluorescence microscope, First epifluorescence microscope, The dichroic mirror. Nature Milestones Light Microscopy* **2009**  
<http://www.nature.com/milestones/milelight/timeline.html>. DOI: 10.1038/ncb1941
- [8] Heimstädt, O. *Z. Wiss. Mikrosk.* **1911**, 28, 330-337.
- [9] Maiman, T.H. *Nature* **1960**, 187(4736), 493–494. DOI: 10.1038/187493a0
- [10] Minsky, M. *Scanning* **1988**, 10, 128–138.
- [11] Cremer, C.; Cremer, T. *Microscopica Acta* **1978**, 81(1), 31–44.
- [12] Denk, W.; Strickler, J.H.; Webb, W.W. *Science* **1990**, 248(4951), 73–76.
- [13] Göppert-Mayer, M. *Ann. Phys.* **1931**, 9, 273–294.
- [14] Kaiser, W.; Garrett, C.G.B. *Phys. Rev. Lett* **1961**, 7(6), 229. DOI: 10.1103/PhysRevLett.7.229
- [15] Xu, C.; Zipfel, W.; Shear, J.B.; Williams, R.M.; Webb, W.W. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1996**, 93(20), 10763–10768.
- [16] Volkmer, A.; Hatrick, D.A.; Birch, D.J.S. *Meas Sci Technol* **1997**, 8(11), 1339–1349. DOI: 10.1088/0957-0233/8/11/021
- [17] Abbe, E. *Archiv für Mikroskopische Anatomie* **1873**, 9, 413–418.
- [18] Hell, S.W. *Nat Biotechnol* **2003**, 21(11), 1347–1355. DOI: 10.1038/nbt895
- [19] Betzig, E.; Patterson, G.H.; Sougrat, R.; Lindwasser, O.W.; Olenych, S.; Bonifacino, J.S.; Davidson, M.W.; Lippincott-Schwartz, J.; Hess, H.F. *Science* **2006**, 313(5793), 1642–1645. DOI: 10.1126/science.1127344
- [20] Rust, M.J.; Bates, M.; Zhuang, X. *Nat Meth* **2006**, 3(10), 793–796. DOI: 10.1038/nmeth929
- [21] Gustafsson, M.G.L. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2005**, 102(37), 13081–13086. DOI: 10.1073/pnas.0406877102
- [22] Baddeley, D.; Batram, C.; Weiland, Y.; Cremer, C.; Birk, U.J. *Nat Protoc* **2007**, 2(10), 2640–2646. DOI: 10.1038/nprot.2007.399
- [23] Chudakov, D.M.; Lukyanov, S.; Lukyanov, K.A. *Trends in Biotechnology* **2005**, 23(12), 605–613.

- [24] Masters, B.R.; So, P.T.C.; Gratton, E. *Biophys. J.* **1997**, 72(6), 2405–2412.
- [25] Flegler, S.L.; Heckman, J.W.; Klomparens, K.L. *Elektronenmikroskopie. Grundlagen, Methoden, Anwendungen* **1995**, Spektrum Akad. Verl, Heidelberg. ISBN: 3860253417
- [26] Staudinger, H. *Ber. dtsch. Chem. Ges. A/B* **1920**, 53(6), 1073–1085. DOI: 10.1002/cber.19200530627
- [27] Stamm, M.; Carlowitz, B. *Plastics, Properties and Testing. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* **2000**, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. ISBN: 9783527306732
- [28] Müller, H.-J.; Röder, T. *Der Experimentator Microarrays* **2004**, Elsevier Spektrum Akad. Verl, Heidelberg. ISBN: 978-3-8274-1438-0
- [29] Dikmans, A.J.; Morr, M.; Zander, N.; Adler, F.; Türk, G.; Frank, R. *Molecular Diversity* **2004**, 8(3), 197–207. DOI: 10.1023/B:MODI.0000036234.66238.4e
- [30] Ivanov, V.B.; Behnisch, J.; Holländer, A.; Mehdorn, F.; Zimmermann, H. *Surf. Interface Anal* **1996**, 24(4), 257–262. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9918(199604)24:4<257::AID-SIA107>3.0.CO;2-1
- [31] Klages, C.-P.; Hinze, A.; Willich, P.; Thomas, M. *Journal of Adhesion Science and Technology* **2010**, 24(6), 1167–1180.
- [32] Hinze, A.; Klages, C.; Zänker, A.; Thomas, M.; Wirth, T.; Unger, W.E.S. *Plasma Process. Polym* **2008**, 5(5), 460–470. DOI: 10.1002/ppap.200700138
- [33] Hoffmann, K.; Mix, R.; Resch-Genger, U.; Friedrich, J.F. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2008**, 1130(1), 28–34. DOI: 10.1196/annals.1430.015
- [34] Bever, M.B. *Encyclopedia of materials science and engineering* **1986**, Pergamon; MIT Press, Oxford [Oxfordshire], Cambridge, MA. ISBN: 0-262-02233-8
- [35] Williams, D. *Surgical Materials. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* **2000**, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. ISBN: 9783527306732
- [36] Frank, M. *Superabsorbents. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* **2000**, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. ISBN: 9783527306732
- [37] Li H. *Smart Hydrogel Modelling* **2009**, Springer, Berlin, Heidelberg. DOI: 10.1007/978-3-642-02368-2
- [38] Moschou E.A.; Bachas L.G.; Daunert S. *Smart Hydrogel Materials. Handbook of Biosensors and Biochips*. **2008**, John Wiley & Sons, Ltd . DOI: 10.1002/9780470061565.hbb134
- [39] Zanolwiak, P. *Pharmaceutical Dosage Forms. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* **2000**, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. ISBN: 9783527306732
- [40] Graumann, K.; Premstaller, A. *Biotechnol J* **2006**, 1(2), 164–186. DOI: 10.1002/biot.200500051
- [41] An, Z. *Therapeutic monoclonal antibodies. From bench to clinic* **2009**, Wiley, Hoboken, NJ. ISBN: 9780470117910
- [42] Oh, S.H.; Kim, J.K.; Song, K.S.; Noh, S.M.; Ghil, S.H.; Yuk, S.H.; Lee, J.H. *J. Biomed. Mater. Res* **2005**, 72A(3), 306–316. DOI: 10.1002/jbm.a.30239
- [43] Li G.; Lu F.; Chen H. (Eye Vision Inst Wenzhou Medica) *Therapeutic corneal contact lens* **2009**, CN101502458.
- [44] Harling, S.; Schwoerer, A.; Scheibe, K.; Daniels, R.; Menzel, H. *Journal of Microencapsulation* **2010**, 27(5), 400–408. DOI: 10.3109/02652040903367301



- [45] Ständer, S.; Szépfalusi, Z.; Bohle, B.; Ständer, H.; Kraft, D.; Luger, T.A.; Metze, D. *Cell and Tissue Research* **2001**, 304(2), 261–269. DOI: 10.1007/s004410000324
- [46] Meyvis, T.; Smedt, S. de; Stubbe, B.; Hennink, W.; Demeester, J. *Pharmaceutical Research* **2001**, 18(11), 1593–1599. DOI: 10.1023/A:1013038716373
- [47] Schwoerer, A.D.A.; Harling, S.; Scheibe, K.; Menzel, H.; Daniels, R. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2009**, 73(3), 351–356.
- [48] Brandl, F.; Kastner, F.; Gschwind, R.M.; Blunk, T.; Teßmar, J.; Göpferich, A. *Journal of Controlled Release* **2010**, 142(2), 221–228.
- [49] Zinth, W.; Zinth, U. *Optik. Lichtstrahlen, Wellen, Photonen* **2009**, Oldenbourg, München. ISBN: 9783486588019
- [50] Szilágyi, A. *EMANIM. Animations of electromagnetic waves v1.01* **2006**, <http://www.enzim.hu/~szia/emanim/emanim.htm>.
- [51] Boyd R.W. *Nonlinear optics* **2008**, Elsevier Academic Press, Amsterdam. ISBN: 9786611763695
- [52] Lakowicz J.R. *Topics in Fluorescence Spectroscopy: Volume 5: Nonlinear and Two-Photon Induced Fluorescence* **2002**, Kluwer Academic Publishers Group, New York, Boston, Dordrecht. ISBN: 0306470705
- [53] McClain, W.M. *J. Chem. Phys.* **1973**, 58(1), 314–323.
- [54] Shternin, P.S.; Gericke, K.-H.; Vasyutinskii, O.S. *Molecular Physics: An International Journal at the Interface Between Chemistry and Physics* **2010**, 108(7), 813–825. DOI: 10.1080/00268970903379221
- [55] Denicke, S.; Gericke, K.H.; Smolin, A.G.; Shternin, P.S.; Vasyutinskii, O.S. *The Journal of Physical Chemistry A* **2010**, 114(36), 9681–9692. DOI: 10.1021/jp101403x
- [56] Denicke, S.G. *Zeit- und polarisationsaufgelöste Multiphotonenmikroskopie. Bildgebende Fluoreszenzlebensdauermessungen und Zweifarben-Zweiphotonen-Anisotropiemessungen* **2010**, Dissertation, Braunschweig.
- [57] Callis, P.R. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1997**, 48(1), 271–297.
- [58] McClain, W.M. *Acc. Chem. Res.* **1974**, 7(5), 129–135.
- [59] Quentmeier, S.; Denicke, S.; Ehlers, J.-E.; Niesner, R.A.; Gericke, K.-H. *J. Phys. Chem. B* **2008**, 112(18), 5768–5773. DOI: 10.1021/jp7113994
- [60] Carriles, R.; Schafer, D.N.; Sheetz, K.E.; Field, J.J.; Cisek, R.; Barzda, V.; Sylvester, A.W.; Squier, J.A. *Rev. Sci. Instrum* **2009**, 80(8), 81101. DOI: 10.1063/1.3184828
- [61] Wang, F.; Liu, X. *Chem. Soc. Rev* **2009**, 38(4), 976–989. DOI: 10.1039/B809132N
- [62] Albota, M.A.; Xu, C.; Webb, W.W. *Appl. Opt* **1998**, 37(31), 7352–7356. DOI: 10.1364/AO.37.007352
- [63] Sheetz, K.E.; Squier, J. *J. Appl. Phys* **2009**, 105(5), 51101. DOI: 10.1063/1.3081635
- [64] So, P.T.C.; Dong, C.Y.; Masters, B.R.; Berland, K.M. *Annu. Rev. Biomed. Eng* **2000**, 2(1), 399–429. DOI: 10.1146/annurev.bioeng.2.1.399
- [65] Kou, L.; Labrie, D.; Chylek, P. *Appl. Opt* **1993**, 32(19), 3531–3540.
- [66] Zipfel, W.R.; Williams, R.M.; Webb, W.W. *Nature Biotechnology* **2003**, 21(11), 1369–1377. DOI: 10.1038/nbt899
- [67] Lakowicz, J.R. *Principles of fluorescence spectroscopy* **2006**, Springer, New York, NY. ISBN: 9780387312781

- [68] Favro, L.D. *Physical Review* **1960**, *119*(1), 53–62.
- [69] Small, E.W.; Isenberg, I. *Biopolymers* **1977**, *16*(9), 1907–1928. DOI: 10.1002/bip.1977.360160907
- [70] Tao, T. *Biopolymers* **1969**, *8*(5), 609–632. DOI: 10.1002/bip.1969.360080505
- [71] Chuang, T.J.; Eienthal, K.B. *J. Chem. Phys* **1972**, *57*(12), 5094. DOI: 10.1063/1.1678194
- [72] Ormö, M.; Cubitt, A.B.; Kallio, K.; Gross, L.A.; Tsien, R.Y.; Remington, S.J. *Science* **1996**, *273*(5280), 1392–1395.
- [73] Andrade, S.; Costa, S.; Borst, J.; Hoek, A. van; Visser, A. *Journal of Fluorescence* **2008**, *18*(3), 601–610. DOI: 10.1007/s10895-008-0329-y
- [74] Baker, G.A.; Watkins, A.N.; Pandey, S.; V. Bright, F. *Analyst* **1999**, *124*(3), 373–379. DOI: 10.1039/A806602G
- [75] Siegel, J.; Suhling, K.; Lévêque-Fort, S.; Webb, S.E.D.; Davis, D.M.; Phillips, D.; Sabharwal, Y.; French, P.M.W. *Rev. Sci. Instrum* **2003**, *74*(1), 182. DOI: 10.1063/1.1519934
- [76] Kapusta, P.; Erdmann, R.; Ortmann, U.; Wahl, M. *J. Fluoresc.* **2003**, *13*(2), 179–183. DOI: 10.1023/A:1022995327718
- [77] Axelrod, D.; Koppel, D.E.; Schlessinger, J.; Elson, E.; Webb, W.W. *Biophys J* **1976**, *16*(9), 1055–1069.
- [78] Zondervan, R.; Kulzer, F.; Kol'chenk, M.A.; Orrit, M. *The Journal of Physical Chemistry A* **2004**, *108*(10), 1657–1665. DOI: 10.1021/jp037222e
- [79] Eggeling, C.; Volkmer, A.; Seidel, C.A.M. *Chemphyschem* **2005**, *6*(5), 791–804. DOI: 10.1002/cphc.200400509
- [80] Uchiyama, S.; Takehira, K.; Kohtani, S.; Imai, K.; Nakagaki, R.; Tobita, S.; Santa, T. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*(6), 1067–1072. DOI: 10.1039/B212575G
- [81] Manica D.P.; Lapos J.A.; Daniel Jones A.; Ewing A.G. *Analytical Biochemistry* **2003**, *322*(11), 68–78.
- [82] Niesner, R.; Roth, W.; Gericke, K.H. *ChemPhysChem* **2004**, *5*(5), 678–687.
- [83] Patterson, G.H.; Piston, D.W. *Biophys J* **2000**, *78*(4), 2159–2162.
- [84] Brown, E.B.; Wu, E.S.; Zipfel, W.; Webb, W.W. *Biophys J* **1999**, *77*(5), 2837–2849.
- [85] Mazza, D.; Braeckmans, K.; Cella, F.; Testa, I.; Vercauteren, D.; Demeester, J.; Smedt, S.S. de; Diaspro, A. *Biophys J* **2008**, *95*(7), 3457–3469. DOI: 10.1529/biophysj.108.133637
- [86] Braeckmans, K.; Stubbe, B.G.; Remaut, K.; Demeester, J.; Smedt, S.C. de *J. Biomed. Opt* **2006**, *11*(4), 44013. DOI: 10.1117/1.2337531
- [87] Braeckmans, K.; Peeters, L.; Sanders, N.N.; Smedt, S.C. de; Demeester, J. *Biophys J* **2003**, *85*(4), 2240–2252.
- [88] Soumpasis, D.M. *Biophys J* **1983**, *41*(1), 95–97.
- [89] Becker, W. *The bh TCSPC Handbook*, 2.Aufl., Becker & Hickl GmbH, Berlin.
- [90] Nielsen, T.; Fricke, M.; Hellweg, D.; Andresen, P. *J. Microsc.* **2000**, *201*, 368–376.
- [91] Felix, A.M.; Toome, V.; Bernardo, S.d.; Weigele, M. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1975**, *168*, 601–608.

- [92] Imai, K.; Toyo'oka, T.; Hiroshi, M. *Analyst* **1984**, *109*, 1365–1373.
- [93] Shear, J.B.; Brown, E.B.; Webb, W.W. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 1778–1783.
- [94] Holländer, A. *Surf. Interface Anal* **2004**, *36*(8), 1023–1026. DOI: 10.1002/sia.1828
- [95] Pippig, F.; Holländer, A. *Applied Surface Science* **2007**, *253*(16), 6817–6823. DOI: 10.1016/j.apsusc.2007.01.120
- [96] Bernardo, S.d.; Weigele, M.; Toome, V.; Manhart, K.; Leimgruber, W.; Böhlen, P.; Stein, S.; Udenfriend, S. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1974**, *163*(1), 390–399. DOI: 10.1016/0003-9861(74)90490-1
- [97] Fery-Forgues, S.; Fayet, J.-P.; Lopez, A. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **1993**, *70*(3), 229–243.
- [98] Uchiyama, S.; Santa, T.; Okiyama, N.; Fukushima, T.; Imai, K. *Biomed. Chromatogr* **2001**, *15*(5), 295–318. DOI: 10.1002/bmc.75
- [99] Greenough, K.P.; Blanchard, G.J. *The Journal of Physical Chemistry A* **2007**, *111*(4), 558–566. DOI: 10.1021/jp065423n
- [100] Simons, S.S., Jr.; Johnson, D.F. *Journal of Organic Chemistry* **1978**, *43*(14), 2886–2891.
- [101] Zuman, P. *Chemical Reviews* **2004**, *104*(7), 3217–3238.
- [102] Orwar, O.; Weber, S.G.; Sandberg, M.; Folestad, S.; Tivesten, A.; Sundahl, M. *Journal of Chromatography A* **1995**, *696*, 139–148.
- [103] Montigny, P. de; Stobaugh, J.F.; Givens, R.S.; Carlson, R.G.; Srinivasachar, K.; Sternson, L.A.; Higuchi, T. *Analytical Chemistry* **1987**, *59*(8), 1096–1101. DOI: 10.1021/ac00135a007
- [104] McGill, C.M.; Swearingen, K.E.; Drew, K.L.; Rasley, B.T.; Green, T.K. *Journal of Heterocyclic Chemistry* **2005**, *42*(4), 475–481. DOI: 10.1002/jhet.5570420401
- [105] Carlson, R.G.; Srinivasachar, K.; Givens, R.S.; Matuszewski, B.K. *Journal of Organic Chemistry* **1986**, *51*, 3978–3983.
- [106] Aminuddin, M.; Miller, J.N. *Talanta* **1995**, *42*(6), 775–778.
- [107] Gregory J. *Molecular Probes Handbook. A Guide of Fluorescent Probes and Research Products* **2002**, Molecular Probes, Eugene, OR.
- [108] Hermanson, G.T. *Bioconjugate techniques* **2008**, Elsevier Acad. Press, Amsterdam. ISBN: 9780123705013
- [109] Boyle, R.E. *The Journal of Organic Chemistry* **1966**, *31*(11), 3880–3882. DOI: 10.1021/jo01349a529
- [110] Bestvater, F.; Spiess, E.; Stobrawa, G.; Hacker, M.; Feurer, T.; Porwol, T.; Berchner-Pfannschmidt, U.; Wotzlaw, C.; Acker, H. *Journal of Microscopy* **2002**, *208*(2), 108–115. DOI: 10.1046/j.1365-2818.2002.01074.x
- [111] Makarov, N.S.; Drobizhev, M.; Rebane, A. *Optics Express* **2008**, *16*(6), 4029–4047.
- [112] Birge, R.R. *KODAK Laser Dyes. KODAK publication JJ-169* **1987**, Eastman Kodak, Rochester, NY.
- [113] Brismar, H.; Trepte, O.; Ulfhake, B. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **1995**, *43*(7), 699–707.
- [114] Al-Majed, A.A.; J. Al-Zehouri, J. *Il Farmaco* **2001**, *56*, 291–296.

- [115] Frank, R. *Tetrahedron* **1992**, 48(42), 9217–9232.
- [116] Lucas, N.; Franke, R.; Hinze, A.; Klages, C.-P.; Frank, R.; Büttgenbach, S. *Plasma Processes Polym.* **2009**, 6S1, S370–S374. DOI: 10.1002/ppap.200930912
- [117] Blackadder, D.A.; Poidevin, G.J. *Le Polymer* **1978**, 19, 483–488.
- [118] Lucas, N.; Demming, S.; Jordan, A.; Sichler, P.; Büttgenbach, S. *Journal of Micromechanics and Microengineering* **2008**, 18(7), 75037.
- [119] Lucas, N.; Hinze, A.; Klages, C.-P.; Büttgenbach, S. *JOURNAL OF PHYSICS D: APPLIED PHYSICS* **2008**, 41(19), 194012. DOI: 10.1088/0022-3727/41/19/194012
- [120] Lucas, N.; Ermel, V.; Kurrat, M.; Büttgenbach, S. *JOURNAL OF PHYSICS D: APPLIED PHYSICS* **2008**, 41(21), 215202. DOI: 10.1088/0022-3727/41/21/215202
- [121] Hinze, A.; Lucas, N.; Büttgenbach, S.; Schiffmann, K.; Willich, P.; Franke, R.; Frank, R.; Klages, C.-P. *Proceedings International Symposium on Plasma Chemistry 19 (ISPC 19)* **2009**.
- [122] Hinze, A.; Marchesseault, A.; Büttgenbach, S.; Steinberg, C.; Schiffmann, K.; Thomas, M.; Klages, C.-P. *Proceedings 6th International Workshop on Microplasmas* **2011**.
- [123] Heim, R.; Prasher, D.C.; Tsien, R.Y. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1994**, 91(26), 12501–12504.
- [124] Patterson, G.; Day, R.N.; Piston, D. *J Cell Sci* **2001**, 114(5), 837–838.
- [125] Xia, N.-S.; Luo, W.-X.; Zhang, J.; Xie, X.-Y.; Yang, H.-J.; Li, S.-W.; Chen, M.; Ng, M.-H. *Marine Biotechnology* **2002**, 4(2), 155–162.
- [126] Subach, O.M.; Gundorov, I.S.; Yoshimura, M.; Subach, F.V.; Zhang, J.; Grünwald, D.; Souslova, E.A.; Chudakov, D.M.; Verkhusha, V.V. *Chemistry & Biology* **2008**, 15(10), 1116–1124. DOI: 10.1016/j.chembiol.2008.08.006.
- [127] Evdokimov, A.G.; Pokross, M.E.; Egorov, N.S.; Zaraisky, A.G.; Yampolsky, I.V.; Merzlyak, E.M.; Shkoporov, A.N.; Sander, I.; Lukyanov, K.A.; Chudakov, D.M. *EMBO Rep* **2006**, 7(10), 1006–1012.
- [128] Blab, G.A.; Lommerse, P.H.M.; Cognet, L.; Harms, G.S.; Schmidt, T. *Chemical Physics Letters* **2001**, 350(1-2), 71–77.
- [129] Heikal, A.A.; Hess, S.T.; Webb, W.W. *Chemical Physics* **2001**, 274(1), 37–55. DOI: 10.1016/S0301-0104(01)00486-4
- [130] *Recombinant green fluorescent protein rTagGFP2*. Evrogen recombinant protein description #FP152, Evrogen JSC.
- [131] *Green fluorescent protein TurboGFP*. Evrogen protein description #006, Evrogen JSC.
- [132] Haupts, U.; Maiti, S.; Schwille, P.; Webb, W.W. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1998**, 95(23), 13573–13578.
- [133] Youvan, D.C.; Michel-Beyerle, M.E. *Nat Biotechnol* **1996**, 14(10), 1219–1220.
- [134] Förster, T. *Naturwissenschaften* **1949**, 36(6), 186–187. DOI: 10.1007/BF00626582
- [135] Volkmer, A.; Subramaniam, V.; Birch, D.J.S.; Jovin, T.M. *Biophys J* **2000**, 78(3), 1589–1598.
- [136] Cotlet, M. *et al. The Journal of Physical Chemistry B* **2001**, 105(21), 4999–5006.
- [137] Olsen, S.; McKenzie, R.H. *Chemical Physics Letters* **2010**, 492(1-3), 150–156. DOI: 10.1016/j.cplett.2010.04.024

- [138] Heim, E.; Harling, S.; Pöhlig, K.; Ludwig, F.; Menzel, H.; Schilling, M. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2007**, 311(1), 150–154.
- [139] Fairbanks, B.D.; Schwartz, M.P.; Bowman, C.N.; Anseth, K.S. *Biomaterials* **2009**, 30(35), 6702–6707. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.08.055
- [140] Levenberg, K. *Quart. Appl. Math.* **1944**, 2, 164–168.
- [141] Marquardt, D. *SIAM J. Appl. Math.* **1963**, 11, 431–441.
- [142] Rasband, W. *ImageJ* v1.43 **2010**, National Institutes of Health (NIH).
- [143] Agoston, M.K. *Computer Graphics and Geometric Modeling. Implementation and Algorithms* **2005**, Springer-Verlag London Limited, London. ISBN: 9781846281082
- [144] Whiteley, K.S.; Heggs, T.G.; Koch, H.; Mawer, R.L.; Immel, W. *Polyolefins. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* **2000**, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. ISBN: 9783527306732
- [145] Klages, C.-P.; Grishin, A. *Plasma Processes Polym* **2008**, 5(4), 368–376.
- [146] Barthel, K.U. *Volume Viewer. ImageJ Plugin* v1.31 **2007**, Internationale Medieninformatik, Berlin.
- [147] O'Hare, L.-A.; Leadley, S.; Parbhoo, B. *Surf. Interface Anal* **2002**, 33(4), 335–342. DOI: 10.1002/sia.1217
- [148] Kumar, R.; Singh, R.K.; Kumar, M.; Barthwal, S.K. *J. Appl. Polym. Sci* **2007**, 104(2), 767–772.
- [149] Nie, H.-Y.; Walzak, M.J.; McIntyre, N.S. *Applied Surface Science* **2006**, 253(4), 2320–2326.
- [150] Sheppard, G.J.R.; Matthews, H.J. *J. Opt. Soc. Am. A* **1987**, 4(8), 1354. DOI: 10.1364/JOSAA.4.001354
- [151] Holländer, A.; Wilken, R.; Behnisch, J. *Surface Coatings and Technology* **1999**, 116–119, 788–791.
- [152] Guimond, S.; Radu, I.; Czeremuskin, G.; Carlsson, D.J.; Wertheimer, M.R. *Plasmas and Polymers* **2002**, 7(1), 71–88. DOI: 10.1023/A:1015274118642
- [153] Strobel, M.; Jones, V.; Lyons, C.S.; Ulsh, M.; Kushner, M.J.; Dorai, R.; Branch, M.C. *Plasmas and Polymers* **2003**, 8(1), 61–95. DOI: 10.1023/A:1022817909276
- [154] Thévenaz, P.; Unser, M. *Microsc. Res. Tech* **2007**, 70(2), 135–146.
- [155] Thomas M.; Klages C.-P.; Eichler M.; Borris J. *Workshop Plasmabehandlung und Plasma-CVD-Beschichtung bei Atmosphärendruck* **2007**, Tagungsband, Dresden.
- [156] Florin S. *Plasticusa.com. Plastics database* **2011** <http://plasticsusa.com/pp.html>.
- [157] Krevelen, D.W. van *Properties of polymers. Their correlation with chemical structure; their numerical estimation and prediction from additive group contributions* **1976**, Elsevier, Amsterdam.
- [158] Baranski T. *Plasmabehandlung von Fasern am IST* **2009**, E-Mail.
- [159] Chen, X.; Yao, L.; Xue, J.; Zhao, D.; Lan, Y.; Qian, X.; Wang, C.X.; Qiu, Y. *Applied Surface Science* **2008**, 2555, Part 2, 2864–2868.
- [160] Wang, C.X.; Ren, Y.; Qiu, Y.P. *Surface and Coatings Technology* **2007**, 202(1), 77–83. DOI: 10.1016/j.surfcoat.2007.04.077

- [161] Ouchi, I.; Miyamura, R.; Sakaguchi, M.; Hosaka, S.; Kitagawa, M. *Polym. Adv. Technol* **1999**, 10(3), 195–198. DOI: 10.1002/(SICI)1099-1581(199903)10:3<195::AID-PAT875>3.0.CO;2-0
- [162] Hearle, J.W.S. *Fibers, 2. Structure. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* **2000**, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. ISBN: 9783527306732
- [163] Beck C.; Dannenmaier J.; Göhl H.; Krause B.; Kurz E.; Malthaner H.; Müller M.; Oehr C.; Storr M. (Gambro Lundia AB, Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der Angewandten Forschung) *A Continous Method for Production of a Regioselective Porous Hollow Fibre Membrane* **2005**, WO2006006918 (A1).
- [164] Rempfer, M. *Plasmafunktionalisierung von Hohlfasermembranen* **2010**, E-Mail.
- [165] Holländer, A. *Surface and Coatings Technology* **2005**, 200(1-4), 561–564. DOI: 10.1016/j.surfcoat.2005.01.091
- [166] Uchiyama, S.; Santa, T.; Fukushima, T.; Homma, H.; Imai, K. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1998**, (10), 2165–2174. DOI: 10.1039/a803641a
- [167] Uchiyama, S.; Santa, T.; Okiyama, N.; Azuma, K.; Imai, K. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2000**, (6), 1199–1207. DOI: 10.1039/B000170H
- [168] Lide, D.R. *CRC Handbook of Chemistry and Physics* **2001**, CRC Press, Boca Raton, FL.
- [169] Bertrand, P.; Jonas, A.; Laschewsky, A.; Legras, R. *Macromol. Rapid Commun* **2000**, 21(7), 319–348. DOI: 10.1002/(SICI)1521-3927(20000401)21:7<319::AID-MARC319>3.0.CO;2-7
- [170] Low, P.; Takama, N.; Beomjoon Kim; Bergaud, C. *Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems Conference, 2007. TRANSDUCERS 2007. International* **2007**, 1055–1058. DOI: 10.1109/SENSOR.2007.4300315
- [171] Acros Organics N.V. *Rhodamine B - Material Safety Data Sheet. ACC# 95508* **2003**.
- [172] Homann, K.-H. *Größen, Einheiten und Symbole in der physikalischen Chemie* **1996**, VCH, Weinheim. ISBN: 3527293264
- [173] Visser, N.V.; Hink, M.A.; van Hoek, A.; Visser, A.J.W.G. *Journal of Fluorescence* **1999**, 9, 251–255. DOI: 10.1023/A:1022515902867
- [174] Chung, I.; Shimizu, K.T.; Bawendi, M.G. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2003**, 100(2), 405–408.
- [175] Cyphersmith, A.; Early, K.; Maksov, A.; Graham, J.; Wang, Y.; Barnes, M. *Appl. Phys. Lett* **2010**, 97(12), 121915.
- [176] Patra, D.; Gregor, I.; Enderlein, J.; Sauer, M. *Appl. Phys. Lett* **2005**, 87(10), 101103. DOI: 10.1063/1.2037194
- [177] Lee, K.C.B.; Siegel, J.; Webb, S.E.D.; Lévêque-Fort, S.; Cole, M.J.; Jones, R.; Dowling, K.; Lever, M.J.; French, P.M.W. *Biophys J* **2001**, 81(3), 1265–1274.
- [178] Akaike, H. *IEEE Transactions on Automatic Control* **1974**, 19(6), 716–723.
- [179] Liu, Y.; Kim, H.-R.; Heikal, A.A. *The Journal of Physical Chemistry B* **2006**, 110(47), 24138–24146. DOI: 10.1021/jp062164t
- [180] Fisz, J.J. *J.Phys.Chem.A* **2007**, 111(50), 12867–12870. DOI: 10.1021/jp0775855
- [181] Fisz, J.J. *J.Phys.Chem.A* **2007**, 111(35), 8606–8621. DOI: 10.1021/jp072113b
- [182] DOW Chemical, *Viscosity of Aqueous Glycerine Solutions. OPTIM™ Glycerine*.

- [183] Bearman G.H.; Bornhop D.J.; Levenson R.M.; Suhling K.; Davis D.M.; Petrusek Z.; Siegel J.; Phillips D. *Biomarkers and Biological Spectral Imaging (Proc. SPIE)* **2001**, 4259, 92–101. DOI: 10.1117/12.432486
- [184] Suhling, K.; Davis, D.M.; Phillips, D. *Journal of Fluorescence* **2002**, 12, 91–95. DOI: 10.1023/A:1015323606154
- [185] Chuang, T.J.; Eisenthal, K.B. *Chemical Physics Letters* **1971**, 11(3), 368–370. DOI: 10.1016/0009-2614(71)80510-9
- [186] Yang, F.; Moss, L.G.; Phillips, G.N. *Nat Biotechnol* **1996**, 14(10), 1246–1251.
- [187] Cubitt, A.B.; Heim, R.; Adams, S.R.; Boyd, A.E.; Gross, L.A.; Tsien, R.Y. *Trends in Biochemical Sciences* **1995**, 20(11), 448–455. DOI: 10.1016/S0968-0004(00)89099-4
- [188] Borst, J.W.; Hink, M.A.; van Hoek, A.; Visser, A.J.W.G. *Journal of Fluorescence* **2005**, 15, 153–160. DOI: 10.1007/s10895-005-2523-5
- [189] Shaner, N.C.; Steinbach, P.A.; Tsien, R.Y. *Nat Meth* **2005**, 2(12), 905–909.
- [190] Nakamura, H.; Sano, A.; Sumi, H. *Analytical Sciences* **1998**, 14(2), 379.
- [191] Swaminathan, R.; Hoang, C.P.; Verkman, A.S. *Biophysical Journal* **1997**, 72(4), 1900–1907.
- [192] Partikian, A.; Ölveczky, B.; Swaminathan, R.; Li, Y.; Verkman, A.S. *The Journal of Cell Biology* **1998**, 140(4), 821–829.
- [193] Schnell, E.A.; Eikenes, L.; Tufto, I.; Erikson, A.; Juthajan, A.; Lindgren, M.; de Lange Davies, C. *J. Biomed. Opt* **2008**, 13(6), 64037.
- [194] Markowitz, M.A.; Turner, D.C.; Martin, B.D.; Gaber, B.P. *Appl Biochem Biotechnol* **1997**, 68(1-2), 57–68.
- [195] Kuimova, M.K.; Yahioglu, G.; Levitt, J.A.; Suhling, K. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, 130(21), 6672–6673.
- [196] Niesner, R.; Gericke, K.-H. *Front. Phys. China* **2008**, 3(1), 88–104. DOI: 10.1007/s11467-008-0002-6

# DANKSAGUNG

Der größte Dank gehört selbstverständlich meinem Doktorvater Herrn Prof. Karl-Heinz „Charly“ Gericke für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, das interessante Forschungsthema und natürlich für die Diskussionen und Hilfestellungen.

Den Herren Prof. Peter Jomo Walla und Prof. Henning Menzel danke ich für die Übernahme des Koreferats beziehungsweise den Prüfungsvorsitz.

Den Zweiphotonenmikroskopikern Dr. Raluca Niesner, Dr. Stefan Quentmeier, Dr. Stefan Denicke und Sebastian Herbrich sei gedankt für die vielen fruchtbaren Diskussionen, die gegenseitige Hilfe und die gute Arbeitsatmosphäre.

Natürlich soll die Arbeitsgruppe Laserchemie nicht unerwähnt bleiben. Auch an Euch danke für die gute Arbeitsatmosphäre, die hilfreichen und interessanten Diskussionen, öfter auch mal bei Sekt und Kuchen. Vor allem die Weihnachtsfeiern und Paddelausflüge werden mir positiv in Erinnerung bleiben.

Großen Dank gilt es auch meinen Projektpartnern auszusprechen. Ohne sie hätte ich nichts zu messen gehabt und ohne ihre Hilfe viele Zusammenhänge nicht so leicht verstanden. Hier möchte ich vor allem Alena Hinze, Andreas Bertz und Herrn Prof. Klages hervorheben. Aber auch Dr. Raimo Franke, Torsten Baranski, Dr. Nina Lucas, Stefanie Wöhl-Bruhn und Martin Rempfer sei mein Dank ausgesprochen.

Danke an Emily Heider, Ph.D. für den interessanten Einblick in ihr Forschungsthema in Braunschweig und Utah.

Ein Dankeschön gilt es auch unserer Sekretärin Frau Simone Lecher und unserer Institutssekretärin Frau Schäfer auszusprechen, dass Sie uns Doktoranden die Formalitäten weitestgehend vom Hals halten und Verständnis für unsere Imperfektion auf dem Bereich der Bürokratie haben. Vor allem auch Dankeschön an Frau Volkert, die leider viel zu früh verstorben ist.

Vielen Dank an die Herren Ahrens, Hilpert und Himstedt aus der Mechanikwerkstatt und Herrn Sladeczek aus der Elektronikwerkstatt für die Anfertigungen der Sonderwünsche, die den Betrieb am Laufen gehalten haben.

Zu guter Letzt auch ein großes Dankeschön an Kristina für die gemeinsame Zeit, die Geduld während der letzten Monate dieser Arbeit und für das Korrektur lesen sowie meinen Eltern für allzeit moralische und finanzielle Unterstützung.